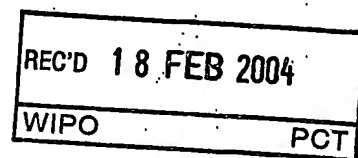


PCT/CZ2003/000078
29.12.2003

ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLUVÉHO VLASTNICTVÍ



potvrzuje, že
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BOTANIKY AKADEMIE VĚD
ČESKÉ REPUBLIKY, Praha, CZ

podal(i) dne 30.12.2002

příhlášku vynálezu značky spisu PV 2002-4273

a že připojené přílohy se shodují úplně
s původně podanými přílohami této přihlášky.

Eva Schneiderová
Za předsedu: Ing. Eva Schneiderová



V Praze dne 9.2.2004



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

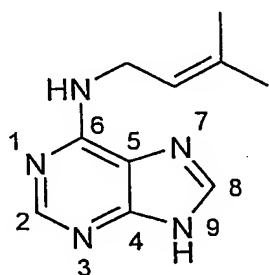
Substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu, způsob jejich přípravy, jejich použití pro přípravu léčiv, kosmetických přípravků a růstových regulátorů, farmaceutické přípravky, kosmetické přípravky a růstové regulátory tyto sloučeniny obsahující

Oblast techniky

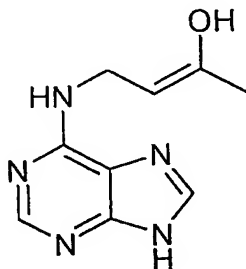
Vynález se týká nových substitučních derivátů N⁶-benzyladenosinu, které mají protinádorové, mitotické, imunosupresivní a antisenescentní účinky pro rostlinné, živočišné i lidské buňky, způsobů přípravy těchto derivátů a jejich použití jako léčiva, farmaceutické kompozice, které tyto deriváty obsahují jako účinnou látku a použití těchto derivátů pro výrobu léčiv, v biotechnologiích, v kosmetickém průmyslu a v zemědělství.

Dosavadní stav techniky

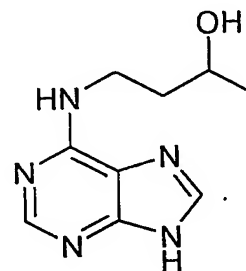
Cytokininy jsou chemicky charakterizovatelné jako N⁶-substituované deriváty adeninu. Současná nomenklatura založená na systému navrženém Lethamem (Planta 181: 361-364, 1974) a Lethamem a Palnim (Ann. Rev. Plant. Physiol. 34: 163-197, 1983) byla původně navržena pro zeatin (Z) a isopentenyladenin (iP). Konjugace purinového kruhu bývá označována číslem polohy substituentu, tak jak je znázorněno v přehledu pro iP.



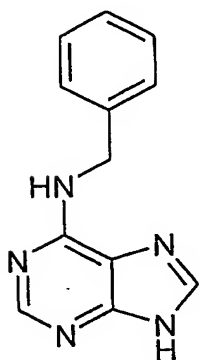
iP



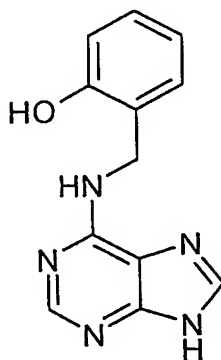
Z



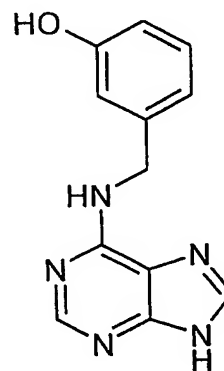
DHZ



BAP



oT



mT

Ve výše uvedeném přehledu chemických vzorců základních cytokininových basí značí iP – N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenin, Z - *trans*-zeatin, DHZ - dihydrozeatin, BAP - 6-benzylaminopurin, oT - *ortho*-topolin, mT - *meta*-topolin.

Cytokinininy lze rozdělit v závislosti na povaze N⁶-postranního řetězce na dvě skupiny: isoprenoidní a aromatické. Isoprenoidní jsou reprezentovány cytokinininy odvozenými od následujících basí: N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenin, dihydrozeatin a zeatin. Mezi aromatické cytokinininy patří 6-benzylaminopurin, *meta*- a *ortho*-topolin a jejich metabolity.

V případě isoprenoidních cytokininů hraje významnou roli konjugace, zahrnující modifikace purinového jádra a N⁶-postranního řetězce. Hlavními formami cytokininových konjugátů v rostlinách jsou 9-ribosidy, 9-ribotidy, 3-, 7-, 9- a O-glukosidy, O-xylosidy, 9-ribosylglukosidy, O-acetyl a O-allyl deriváty a rovněž konjugáty cytokininů s alaninem (viz. detaily Mok, D.W.S., Mok, M.C.: Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. CRC Press, Boca Raton, London, Tokyo 1994).

Zatímco volné báse představují aktivní formy cytokininů (Laloue a Pethe, In: Wareing, P.F. (ed.): Plant Growth Substances 1982. Pp. 185-195. Academic Press, London 1982), jejich ribosidy jsou důležitými transportními formami v xylému a dominantními formami v rostlinných pletivech. Centrálními sloučeninami v metabolismu cytokininů jsou ribosid-5'-monofosfáty (Laloue et al. FEBS Let. 46: 45-50, 1974; Physiol. Veg. 13: 781-796, 1975; Plant Physiol. 59: 478-483, 1977; In: Guern, J., Péaud-Lenoël, C., (eds.): Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins. Pp.80-96. Springer-Verlag, Berlin 1981; Mok et al., J. Plant Physiol. 130: 423-431, 1987), které zůstávají akumulovány v buňkách i proti vysokému koncentračnímu gradientu, a to díky nepropustnosti buněčných membrán pro tyto metabolity (Laloue et al., 1974, 1975, Laloue a Pethe In: Wareing, P.F. (ed.): Plant Growth Substances 1982. Pp. 185-195. Academic Press, London 1982.).

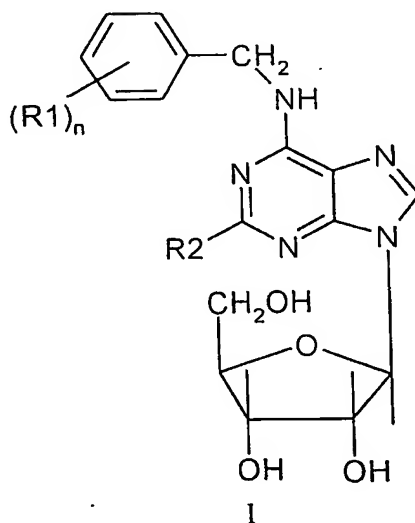
Cytokinininy plní v rostlinách velmi rozmanité funkce, a to od buněčného dělení, prodlužování a diferenciaci, až k tvorbě květů a plodů. Ruší dormanci semen, potlačují apikální dominanci a stimulují růst postranních pupenů, zpomalují stárnutí buněk, zvyšují odolnost proti stresům, ovlivňují permeabilitu buněčných membrán a vyvolávají akumulaci metabolitů v místě jejich aplikace (Letham a Palni 1983 - Ann. Rev. Plant. Physiol. 34: 163-197, 1983, Mok, D.W.S., Mok, M.C.: Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. CRC Press, Boca Raton, London, Tokyo 1994).

Vzhledem k tomu, že se veškeré organismy na Zemi evolučně vyvíjely společně po mnoho desítek miliónů let, je předpokladatelné, že pro látky rostlinného původu, jakými cytokinininy zaručeně jsou, si příroda našla mnoho regulačních vazeb k živočichům, a tedy i k člověku. Látky cytokininové povahy proto zřejmě ovlivňují značné množství molekulárních mechanismů v živočišných i lidských buňkách. Nedávno jsme zjistili, že N⁶-substituované adenosiny a jejich deriváty mohou být základem pro vývoj nových generací léčiv s protinádorovými, antiinflatorními, imunosupresivními, antivirálními a dalšími, medicínsky významnými účinky.

Cílem tohoto vynálezu je proto poskytnout protinádorové, imunosupresivní, růstově regulační, morfogeneticky aktivní a antisenescenční dusíkaté heterocyklické sloučeniny derivátů na bázi C2- a na fenyly substituovaného 6-benzylaminopurin ribosidu s vysokou selektivitou a terapeutickým indexem účinnosti, tj. sloučeniny, které jsou málo toxické a přitom vysoce účinné.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu obecného vzorce I



a jejich farmaceuticky využitelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, ve kterých R2 znamená atom vodíku, hydroxyl, halogen, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, methylmerkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl nebo karbamoyl skupinu, a

$(R1)_n$, ve které

n znamená 2 až 6 uhlíkový atom fenylu substituovaný jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující $R1$ kde

$R1$ znamená atom vodíku, hydroxyl, halogen, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, methylmerkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl nebo karbamoyl alkyl, substituovaný alkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloalkylalkyl, arylalkyl, heteroalkyl, heteroarylalkyl, cykloheteroalkyl alkyl nebo $R1'-X$, ve které

X znamená $NH-$, $-N(C_1-C_6\text{-alkyl})-$, skupinu $-O-$ nebo skupinu $-S-$ a

$R1'$ znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, acyl, amido, sulfo, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, aryl, substituovaný aryl, heterocyklus, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, arylalkyl, cykloheteroalkyl, substituovaný cykloheteroalkyl, heteroarylalkyl, heteroalkyl, cykloalkyl alkyl a cykloheteroalkyl alkyl.

Výše uvedené dosud nevymezené generické skupiny mají významy uvedené v následující legendě, přičemž

halogen znamená

atom halogenu vybraný ze skupiny zahrnující atom fluoru, atom bromu, atom chloru a atom jodu,

alkyl znamená

- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

substituovaný alkyl znamená

- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinou, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

karbyloxy znamená

.skupinu $-OR_a$, ve které R_a znamená alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl nebo substituovaný cykloheteroalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

karbylmerkpto znamená

.skupinu $-SR_b$, ve které R_b znamená alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl nebo substituovaný cykloheteroalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

sulfo znamená $-SO_3R_c$, ve které R_c znamená

atom vodíku H,

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty zvoleným ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

sulfoamido znamená $-NH SO_3R_d$, kde R_d znamená

atom vodíku H,

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

acyl znamená

skupinu $-C(O)R_c$, ve které R_c znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

aryloxy znamená

skupinu $-OAr$, ve které Ar znamená aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

alkylamino znamená

skupinu $NR_fR'_g$, ve které R_f a R'_g nezávisle jeden na druhém znamenají atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

amido znamená

skupinu $-C(O)NR_hR'_i$, ve které R_h a R'_i nezávisle jeden na druhém znamenají atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

karboxyl znamená

.skupinu $-C(O)OR_j$, ve které R_j znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

karbamino znamená

.skupinu $-NHCOR_k$, ve které R_k znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

aryl znamená

.aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem jako fenyl nebo bifenyl nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický jako 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl,

substituovaný aryl znamená

aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem jako fenyl nebo bifenyl nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický jako 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

heterocyklus znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku,

heteroaryl znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický,

substituovaný heteroaryl znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

arylalkyl znamená

.skupinu $-R_1-Ar$, kde Ar znamená arylovou skupinu a R_1 znamená
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
 .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
 .aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem jako fenyl nebo bifenyl nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický jako 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

heteroalkyl znamená

.skupinu $-R_m-L$, ve které R_m znamená
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
 .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující
 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze
 skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro,
 amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto,
 karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické
 substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících
 skupin uvedenými v této legendě,

a L znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden
 heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku a případně
 substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl,
 alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido,
 acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl
 a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy,
 které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

heteroarylalkyl znamená

.skupinu $-R_n-G$, ve které R_n znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
 .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující
 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze
 skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro,
 amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto,
 karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické
 substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících
 skupin uvedenými v této legendě,

a G znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden
 heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, přičemž

alespoň jeden heterocyklický kruh této skupiny je aromatickým kruhem, která může být případně substituována jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

cycloalkyl znamená

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů,

substituovaný cycloalkyl znamená

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

heterocycloalkyl znamená

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, nebo fosfor,

substituovaný cykloheteroalkyl znamená

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku nebo atomem fosforu, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl

a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

cykloalkylalkyl znamená

- .skupinu $-R_n-J$, ve které R_n znamená
- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a J znamená

- .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, nebo
- .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě, a

a heterocykloalkylalkyl znamená

- .skupinu $-R_p-V$, ve které R_p znamená
- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze

skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a V znamená

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku nebo atomem fosforu,

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku nebo atomem fosforu, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami.

Mimořádně výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu ze skupiny zahrnující:

6-(2-fluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-fluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
fluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-bromobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
bromobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-iodobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
iodobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-iodobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
chlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-chlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
chlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-chlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
acetylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-acetylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
acetylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-karboxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
karboxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-acetoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
acetoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-acetoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
nitrobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-nitrobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-

nitrobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-sulfobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
sulfoobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-sulfobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
kyanobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-kyanobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
kyanobenzylamino)purin	ribosid,	6-(5-nitro-2-methylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
methylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-methylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
methylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-methylaminobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
methoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-methoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
methoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-hydroxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
hydroxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-hydroxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
hexylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-hexyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
formylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-formylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
formylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-ethoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
ethoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-ethoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
ethylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-penthylobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
penthyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-fenoxibenzyllamino)purin	ribosid,	6-(4-
fenylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-propylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
propyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-oktylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
octyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-ethyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,4-
diacetoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-diacetoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,5-
diaminobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-dibromobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-dibromo-
4-methoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,3-dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,4-
dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,5-dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,6-
dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,4-dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-
dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,3,4,5-tetrafluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
chloro-3,6-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(5-chloro-2-fluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,3,4-trifluorobenzylamino)purin
6-(2,3,4-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,3,5-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-
(2,4,5-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,4,5-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-
(2,3,6-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-
6-(2-chloro-6-fluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,6-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-
(2,4-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,4-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,5-
difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(5-fluoro-2-
(trifluoromethyl)benzylamino)purin	ribosid,	6-(4-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
ribosid,	6-(2-chloro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin	ribosid,	6-(2-	

(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-(difluoromethoxy)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(4-(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-5-
 (trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-
 (trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-3-
 (trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-6-fluoro-3-methylbenzylamino)purin
 purin ribosid, 6-(6-chloro-2-fluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2-fluoro-5-
 (trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2-fluoro-6-
 (trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-difluoro-4-methylbenzylamino)purin
 ribosid, 6-(2,6-difluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-6-
 (trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid,
 6-(3-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-4-methyl benzylamino)purin
 ribosid, 6-(4-fluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(5-fluoro-2-
 methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-3,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 (trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-5-
 (trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-
 (2-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 (trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloro-3-(trifluoromethyl) benzylamino)purin
 ribosid, 6-(4-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-
 bis(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(4-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 (trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-diethylaminobenzylamino)purin ribosid, 6-
 (3,4-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-
 dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-ethylenedioxybenzylamino)purine ribosid, 6-(2,4-
 dihydroxybenzylamino)purin, 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-
 dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-
 dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-
 dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-
 dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-
 hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin
 ribosid, 6-(2-hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-
 methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-

hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin
 ribosid, 6-(3-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-2-
 methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin
 ribosid, 6-(2-hydroxy-3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,5-
 dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid,
 6-(2-hydroxy-4,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4,6-
 dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid,
 6-(3-hydroxy-4,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-4,6-
 dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-2,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid,
 6-(3-hydroxy-2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-2,6-
 dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-2,3-dimethoxybenzylamino)purin ribosid,
 6-(4-hydroxy-2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-2,6-
 dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid,
 6-(4-hydroxy-3,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-4-
 methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-
 (2,3-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dihydroxy-3-
 methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dihydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-
 (2,4-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dihydroxy-3-
 methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-
 (2,5-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-
 methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid,
 6-(2,6-dihydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxy-2-
 methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-
 (3,4-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dihydroxy-2-
 methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-
 (3,5-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,4-trimethoxybenzylamino)purin
 ribosid, 6-(2,4,5-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trimethoxybenzylamino)purin
 ribosid, 6-(3,4,5-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,4,5-
 trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxybenzylamino)purin
 ribosid, 6-(2-hydroxy-4,5,6-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-
 trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,4-trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-
 trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,4-trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4,5-

trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dihydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-dibromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-diiodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-methyl-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-methyl-4-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-diiodo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloro-3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-6-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(5-chloro-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin

ribosid, 6-(4-chloromethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-5-nitrobenzylamino)purin
 ribosid, 6-(2-chloro-6-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloro-3-nitrobenzylamino)purin
 ribosid, 6-(5-chloro-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-bromo-4-
 hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dibromo-4-hydroxybenzylamino)purin, 6-(3-bromo-
 4-methoxybenzylamino)purin, 6-(4-bromomethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 butoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-butoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-t-
 butyl/benzylamino)purin ribosid, 6-(4-t-butyl-2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-
 aminobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-aminobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 aminobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-
 4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-
 amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-
 (3-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid,
 6-(3-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-diamino-3-chlorobenzylamino)purin
 ribosid, 6-(2,6-diamino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-amino-3-
 chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-amino-5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(5-
 amino-2-methylbenzylamino)purine ribosid, 6-(2-amino-3-nitrobenzylamino)purine ribosid, 6-
 (4-amino-3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-benzyloxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-
 acetylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-acetylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,5-
 trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-
 trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,4-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,5-
 trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5,6-
 trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo
 methylmercapto)-6-(2-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro,
 bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino,
 hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluorobenzylamino)purin
 ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-
 bromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo
 methylmercapto)-6-(3-bromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro,
 bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-bromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino,
 hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-iodobenzylamino)purin
 ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-
 iodobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo
 methylmercapto)-6-(4-iodobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro,

bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-karboxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-karboxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-acetoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-acetoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-acetoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-nitrobenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-sulfobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-sulfoobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-sulfobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-kyanobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-kyanobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-kyanobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-nitro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-methylaminobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-

methylmercapto)-6-(2,4-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,4,5-tetrafluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-3,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-chloro-2-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,4-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,5-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,5-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4,5-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,6-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-

(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-fluoro-3-methylbenzylamino)purin purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(6-chloro-2-fluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2-fluoro-6-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-difluoro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-difluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-6-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluoro-4-methyl benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-fluoro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-3,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo

methylmercapto)-6-(2-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-bis(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-diethylaminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-ethylenedioxybenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dihydroxybenzylamino)purin, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-

[illegible]

diiodobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dihydroxy-3,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluoro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-methyl-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-methyl-4-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-diiodo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloro-3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-chloro-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid,

2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloromethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloro-3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-chloro-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-bromo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dibromo-4-hydroxybenzylamino)purin, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-bromo-4-methoxybenzylamino)purin, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-bromomethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-butoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-butoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-/t-butyl/benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-t-butyl-2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-aminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-aminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-aminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-diamino-3-chlorobenzylamino)purin

ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-diamino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-amino-5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-amino-2-methylbenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-3-nitrobenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-amino-3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-benzyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,4-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid.

Výchozím materiálem pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I je 6-chloropurin ribosid připravený z hypoxanthinu chlorací pomocí POCl_3 (Davoll and Blowy, J. Am. Chem. Soc. 73:2936 (1957)) anebo je komerčně dostupný (Sigma, Aldrich, Fluka, atd.).

Dalším výchozím materiálem pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I je 6-bromopurin ribosid, který je možné buď připravit z adeninu nebo hypoxanthinu reakcí s n-pentyl nitritem v tribrommetanu, nebo je komerčně dostupný. Výchozím materiálem pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I je také 6-fluoropurin ribosid, který lze připravit z 6-chloropurinu ribosidu reakcí s triethylaminem za vzniku kvarterní amoniové soli, která pak reakcí s tetrabutylammonium triphenyldifluorosilikátem v dimethylformamidu může být konvertována na 6-fluoropurin ribosid (Gurvich et al., Nucleos. Nucleot. 18: 2327 (1999)).

Dalším výchozím materiálem pro přípravu sloučenin obecného vzorce I jsou substituované benzylaminy. Ty, které obsahují jednu nebo více hydroxylových skupin, nejsou komerčně dostupné a mohou být připraveny demethylací příslušných methoxyderivátů pomocí 48% HBr v atmosféře dusíku N₂.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob přípravy substitučních derivátů N⁶-benzyladenosinu obecného vzorce I, ve kterém R₁ a R₂ mají výše uvedené významy a jehož podstata spočívá v tom, že se v jednom přístupu dusíkatý heterocyklický derivát obecného vzorce I, ve kterém R₃ znamená atom chloru nebo bromu nebo fluoru nebo skupinu methylthio a ve kterém R₂ má výše uvedený význam, nukleofilně substituují v poloze 6 za účelem převedení atomu chloru, bromu nebo fluoru v poloze 6 za některý jiný z významů obecného substituentu R₁ uvedených výše za vzniku derivátu obecného vzorce I.

Pro jejich přípravu lze s výhodou využít příslušné 2-chloro, 2-hydroxy, 2-amino, 2-methylmercapto deriváty 6-chloropurin ribosidu (Nair and Young, Synthesis 6: 450 (1986); Nair and Fasbender, Tetrahedron 49: 2169 (1993)).

Předmětem vynálezu jsou rovněž substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu obecného vzorce I pro použití jako léčiva.

Předmětem vynálezu jsou rovněž substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu obecného vzorce I pro použití jako růstové regulátory rostlin, savců, mikroorganismů, kvasinek a hub.

Předmětem vynálezu jsou rovněž substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu obecného vzorce I pro použití jako kosmetické přípravky.

Předložený vynález rovněž zahrnuje farmaceutické, kosmetické a tkáňové přípravky obsahující sloučeninu obecného vzorce I či farmaceuticky přijatelnou sůl takovéto sloučeniny včetně farmaceutického nosiče.

Předmětem vynálezu je rovněž použití sloučeniny obecného vzorce I při přípravě afinitních adsorpčních nosičů, imobilizovaných enzymů pro kontrolu výrobních procesů, reagensů pro imunodetekci, diagnostických vzorků, ¹⁴C, ³H, avidinem a biotinem značených sloučenin a oligonukleotidů.

Dále je předmětem vynálezu použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi substitučního derivátu N⁶-benzyladenosinu obecného vzorce I nebo farmaceuticky přijatelných solí takovéto sloučeniny včetně farmaceutického nosiče pro přípravu farmaceutické kompozice použitelné jako mitotikum či antimitotikum, zejména při léčení nádorových onemocnění, při psoriáze, revmatické artritidy, lupusu, diabetu I typu, roztroušené skleróze, restenóze, polycystickému onemocnění ledvin, host graft disease a dny, parazitózách způsobených

houbami anebo prvoky, Alzheimerově chorobě, anebo jako antineurogenerativního léčiva, anebo k supresi imunostimulace.

Předmětem vynálezu je rovněž použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi substitučního derivátu N⁶-benzyladenosinu obecného vzorce I jako kosmetického přípravku pro zpomalení senescence savčích pokožkových buněk, jako keratinocytů či fibroblastů.

Předmětem vynálezu je rovněž použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi substitučního derivátu N⁶-benzyladenosinu obecného vzorce I jako růstového regulátoru v tkáňových kulturách ke stimulaci proliferace a morfogeneze.

Předmětem vynálezu je rovněž použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi substitučního derivátu N⁶-benzyladenosinu obecného vzorce I pro výrobu přípravků používaných ke klonování rostlinných i savčích zárodečných buněk a embryí, s výhodou oocytů.

Předmětem vynálezu je konečně použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi substitučního derivátu N⁶-benzyladenosinu obecného vzorce I pro výrobu léčiva na potlačení imunostimulace například arthritidy nebo při supresi rejekce transplantovaných orgánů u savců.

Terapeutická aplikace

Vhodné cesty pro aplikaci jsou orální, rektální, vazální místní (zahrnující okulární, bukalní a sublinguální), vaginální a parenterální (zahrnující subkutánní, intramuskulární, intravitreózní, nitrožilní, intradermální, intrathekální a epidurální). Preferovaný způsob podání závisí na stavu pacienta, toxicitě sloučeniny a místě infekce, kromě ostatních ohledů známých klinikovi.

Terapeutický přípravek obsahuje od 1 do 95% aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90% aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují přednostně od 5 do 20% aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou například potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky, čípky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou například masti, krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Příkladem jsou tobolky obsahující od 0.05g do 1.0g aktivní látky.

Farmaceutické přípravky tohoto vynálezu jsou připravovány známým způsobem, například běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy.

Přednostně jsou používány roztoky aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze a disperze, které mohou být připraveny před

použitím, například v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je manitol. Farmaceutické přípravky mohou být sterilizovány anebo obsahují látky neutrální povahy, například konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačla anebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku anebo pufry. Jsou připravovány známým způsobem, například běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspence mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako například sodnou sůl karboxymethylcelulosu, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatinu.

Olejové suspence obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalné estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8-22, s výhodou pak 12-22 uhlíkových atomů, například kyselinu laurovou, tridekanovou, myristovou, pentadekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidonovou a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, například kyselinu olejovou, alaidikovou, eurikovou, brasidovou a linoleovou, případně s přídavkem antioxidantů, například vitaminu E, β -karotenu nebo 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin nemá více než 6 uhlíkových atomů a je mono- nebo polyhydričká, například mono-, di- nebo trihydričné alkoholy jako metanol, etanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich isomery, ale hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou například ethyl oleát, isopropyl myristát, isopropyl palmitát, „Labrafil M 2375“ (polyoxyethylen glycerol trioleát, Gattefoscé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholýzou oleje z meruňkových jader a složený z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoscé, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholýzou TCM a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoscé, Paříž), „Miglyol 812“ (triglycerid nasycených mastných kyselin s délkou řetězce C_8 až C_{12} od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sesamový olej, sójový olej a olej z podzemnice olejné.

Příprava injekčního přípravku se provádí za sterilních podmínek obvyklým způsobem, například plněním do ampulí nebo lahviček a uzavíráním obalů.

Farmaceutické přípravky například pro orální použití se mohou získat smícháním aktivní látky s jedním nebo více tuhými nosiči, případnou granulací výsledné směsi, a pokud je to požadováno zpracováním směsi nebo granulí do tablet nebo potahovaných tablet přídavkem dalších neutrálních látek.

Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, například laktosa, sacharosa, manitol nebo sorbitol, celulosové preparáty anebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogenfosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulosa, hydroxypropylmethylcelulosa, sodná sůl karboxymethylcelulosity a polyvinylpyrrolidin, a pokud požadováno desintegrátory jako výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesíťovaný polyvinylpyrrolidin, alginová kyselina a její soli, s výhodou alginát sodný. Další neutrální látky jsou regulátory toku a lubrikanty, s výhodou kyselina salicylová, talek, kyselina stearová a její soli jako stearát hořečnatý nebo vápenatý, polyethylen glykol nebo jeho deriváty.

Jádra potahovaných tablet mohou být vybavena vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči žaludeční šťávě, přičemž používané potahy jsou mezi jinými koncentrované roztoky cukrů, které mohou obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidin, polyethylen glykol a nebo oxid titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích rozpouštědel, či pro přípravu potahů odolných vůči žaludeční šťávě roztoky vhodných celulosových preparátů jako acetylcelulosaftalát nebo hydroxypropylmethylcelulosaftalát. Barviva nebo pigmenty jsou přimíchávána do tablet nebo potahovaných tablet například pro identifikaci nebo charakterizaci různých dávek účinné složky.

Farmaceutické přípravky které mohou být užívány orálně jsou také tvrdé tobolky ze želatiny nebo měkké uzavřené tobolky ze želatiny a změkčovadla jako glycerol nebo sorbitol. Tvrdé tobolky mohou obsahovat aktivní látku ve formě granulí, smíchanou například s plnidly jako je kukuřičný škrob, pojivy nebo lubrikanty jako talek nebo stearát hořečnatý, a se stabilizátory. V měkkých tobolkách je aktivní látka přednostně rozpuštěna nebo suspendována ve vhodných kapalných látkách neutrální povahy jako mazací tuk, parafinový olej nebo kapalný polyethylen glykol či estery mastných kyselin a ethylen nebo propylen glykolu, přičemž je také možno přidat stabilizátory a detergenty například typu esterů polyethylen sorbitanových mastných kyselin.

Ostatní formy orálního podávání jsou například sirupy připravované běžným způsobem, které obsahují aktivní složku například v suspendované formě a v koncentraci okolo 5 až 20%, přednostně okolo 10% nebo podobné koncentrace, která umožňuje vhodnou individuální dávku, například když je měřeno 5 nebo 10 ml. Ostatní formy jsou například práškové nebo kapalně koncentráty pro přípravu koktejlů, například v mléce. Takovéto koncentráty mohou být také baleny v množství odpovídajícím jednotkové dávce.

Farmaceutické přípravky, které mohou být používány rektálně, jsou například čípky, které obsahují kombinaci aktivní látky se základem. Vhodné základy jsou například přírodní nebo syntetické triglyceridy, parafinové uhlovodíky, polyethylen glykoly nebo vyšší alkoholy.

Přípravky vhodné pro parenterální podání jsou vodné roztoky aktivní složky ve formě rozpustné ve vodě, například ve vodě rozpustná sůl nebo vodná injekční suspenze, která obsahuje látky zvyšující viskozitu, například sodnou sůl karboxymethylcelulosity, sorbitol nebo dextran, a stabilizátory tam kde je to vhodné. Aktivní látka může být také přítomna ve formě lyofilizátu společně s neutrálními látkami kde je to vhodné a může být rozpuštěna před parenterální aplikací přidáním vhodných rozpouštědel. Roztoky které jsou použity pro parenterální aplikaci, mohou být použity například pro infúzní roztoky. Preferovaná konzervovadla jsou s výhodou antioxidanty jako kyselina askorbová, nebo mikrobicidy kyselina sorbová či benzoová.

Masti jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují ne více než 70%, ale přednostně 20 až 50% vody nebo vodné fáze. Tukovou fází tvoří uhlovodíky, například vazelína, parafinový olej nebo tvrdé parafíny, které přednostně obsahují vhodné hydroxysloučeniny jako mastné alkoholy a jejich estery, například cetyl alkohol, nebo alkoholy lanolinu, s výhodou lanolin pro zlepšení kapacity pro vázání vody. Emulgátory jsou odpovídající lipofilní sloučeniny jako sorbitanové estery mastných kyselin (Spany), s výhodou sorbitan oleát nebo sorbitan isostearát. Aditiva k vodné fázi jsou například smáčedla jako polyalkoholy, například glycerol, propylen glykol, sorbitol a polyethylen glykol, nebo konzervační prostředky či příjemně vonící látky.

Mastné masti jsou nevodné a obsahují jako bázi hlavně uhlovodíky, například parafin, vazelinu nebo parafinový olej, a dále přírodní nebo semisyntetické tuky, například hydrogenované kokosové triglyceridy mastných kyselin nebo hydrogenované oleje, například hydrogenovaný ricínový olej nebo z podzemnice olejný, a dále částečné glycerolové estery mastných kyselin, například glycerol mono- a distearát. Dále obsahují například mastné alkoholy, emulgátory a aditiva zmíněná v souvislosti s mastmi, která zvyšují příjem vody.

Krémy jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují více než 50% vody. Používané olejové báze jsou mastné alkoholy, například isopropyl myristát, lanolin, včelí vosk, nebo uhlovodíky, s výhodou vazelína (petrolátum) a parafinový olej. Emulgátory jsou povrchově aktivní sloučeniny s převážně hydrofilními vlastnostmi, jako jsou odpovídající neiontové emulgátory, například estery mastných kyselin polyalkoholů nebo jejich ethylenoxy adukty, například polyglycerických mastných kyselin nebo polyethylen sorbitanové estery či kyselé estery polyglycerických mastných kyselin (Tween), dále polyoxyethylenové estery mastných alkoholů

nebo polyoxyethylenové estery mastných kyselin, nebo odpovídající iontové emulgátory, jako alkalické soli sulfátů mastných alkoholů, s výhodou laurylsulfát sodný, cetylsulfát sodný nebo stearylsulfát sodný, které jsou obvykle používány v přítomnosti mastných alkoholů, například cetyl stearyl alkoholu nebo stearyl alkoholu. Aditiva k vodné fázi jsou mimo jiné činidla, která chrání krémy před vyschnutím, například polyalkoholy jako glycerol, sorbitol, propylen glykol a polyethylen glykol, a dále konzervační činidla a příjemně vonící látky.

Pasty jsou krémy nebo masti obsahující práškové složky absorbující sekreci jako jsou oxidy kovů, například oxidy titanu nebo oxid zinečnatý, a dále talek či silikáty hliníku, které mají za úkol vázat přítomnou vlhkost nebo sekreci.

Pěny jsou aplikovány z tlakových nádob a jsou to kapalné emulze oleje ve vodě v aerosolové formě, přičemž jako hnací plyny jsou používány halogenované uhlovodíky, jako chloro-fluoro nižší alkany, například dichlorofluoromethan a dichlorotetrafluoroethan, nebo přednostně nehalogenované plynné uhlovodíky, vzduch, N_2O či oxid uhličitý. Používané olejové fáze jsou stejné jako pro masti a také jsou používána aditiva tam zmíněná.

Tinktury a roztoky obvykle obsahují vodně-etanolickou bázi, ke které jsou přimíchány zvlhčovačla pro snížení odpařování jako jsou polyalkoholy, například glycerol, glykoly a polyethylen glykol, dále promazávací jako estery mastných kyselin a nižších polyethylen glykolů, tj. lipofilní látky rozpustné ve vodné směsi nahrazující tukové látky odstraněné z kůže etanolem, a pokud je to nutné i ostatní neutrální látky a aditiva.

Tento vynález dále poskytuje veterinární přípravky obsahující nejméně jednu aktivní složku společně s veterinárním nosičem. Veterinární nosiče jsou materiály pro aplikaci přípravku a mohou to být látky pevné, kapalné nebo plynné, které jsou inertní nebo přijatelné ve veterinární medicíně a jsou kompatibilní s aktivní složkou. Tyto veterinární přípravky mohou být podávány orálně, parenterálně nebo jakoukoli jinou požadovanou cestou.

Vynález se také vztahuje na procesy nebo metody pro léčení nemocí zmíněných výše. Látky mohou být podávány profylakticky nebo terapeuticky jako takové nebo ve formě farmaceutických přípravků, přednostně v množství které je efektivní proti zmíněným nemocem, přičemž u teplokrevných živočichů, například člověka, vyžadujícího takovéto ošetření je látka používána zejména ve formě farmaceutického přípravku. Na tělesnou hmotnost okolo 70 kg je aplikována denní dávka látky okolo 0.1 až 50g, s výhodou 0.5 až 10 g.

V dalším jsou nové sloučeniny obecného vzorce I a způsoby jejich přípravy a použití osvětleny na příkladech, aniž se tím jakoliv omezují.

Přehled příkladů

Na obr. 1 je znázorněna indukce proteinu p21^{WAF-1} v buňkách MCF-7 působením rozdílných koncentrací 2OH3MeOBAPR v řádu jednotek μmol na litr kultivačního média.

Na obr. 2 je znázorněna indukce p21^{WAF-1} v buňkách MCF-7 v rozmezí 6-24 hodin po přidavku 2OH3MeOBAPR (6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino) purin ribosid) v 1 μM koncentraci.

Na obr. 3 je znázorněna inhibice růstu nádorových buněčných linií CEM (A) and HL60 (B) novými cytokininy. Cytotoxicita byla stanovena pomocí testu Calcein AM. Aktivita je vyjádřena v procentech maximální aktivity (v nepřítomnosti inhibitoru). ZR: zeatin ribosid; oTR: *ortho*-topolin ribosid; 3F-BAPR: 6-(3-fluorobenzylamino)purin ribosid; 3Cl-4FBAPR: 6-(3-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid; 2OH3MeOBAPR: 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino) purin ribosid.

Na obr. 4 je znázorněna inhibice proliferace buněk HL-60 indukovaná 2OH3MeOBAPR. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 2OH3MeOBAPR v koncentraci 2.5 μM (plné kroužky), 5 μM (prázdné čtverce), 10 μM (plné čtverce), 20 μM (prázdné trojúhelníky), 40 μM (plné trojúhelníky) a 60 μM (prázdné šestiúhelníky). Buňky kultivované ve standardním médiu bez 2OH3MeOBAPR sloužily jako kontrola (prázdné kroužky).

Na obr. 5 je znázorněna indukce apoptosy 2OH3MeOBAPR u buněk HL-60. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 2OH3MeOBAPR v uvedených koncentracích. Po 24 h inkubaci byl sledován výskyt apoptotických buněk vzhledem k morfologii jader. Buňky kultivované ve standardním médiu bez 2OH3MeOBAPR sloužily jako kontrola.

Obr. 6 znázorňuje vliv 2OH3MeOBAPR na morfologii jader u buněk HL-60. Jádra buněk kultivovaných za standardních podmínek v médiu bez 2OH3MeOBAPR a), jádra buněk kultivovaných v médiu s přidavkem 5 μM 2OH3MeOBAPR po dobu 24 hodin b)

Obr. 7 znázorňuje vliv 2OH3MeOBAPR na integritu jaderné DNA u buněk HL-60. M - standardy molekulové hmotnosti. Pozice 1- DNA izolovaná z buněk kultivovaných v médiu bez iPA. Pozice 2-6 DNA izolovaná z buněk kultivovaných v médiu s přidavkem 5, 10, 20 40 a 60 μM 2OH3MeOBAPR po dobu 24 h.

Na obr. 8 je znázorněn vliv 2OH3MeOBAPR (6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid) na buněčný cyklus. Buňky byly kultivovány a) ve standardním v médiu bez 2OH3MeOBAPR (kontrola), b) v médiu obsahujícím 5 μM 2OH3MeOBAPR po dobu 24h před analýzou pomocí průtokové cytometrie.

Na obr. 9 je znázorněn vliv 2OH3MeOBAPR na aktivaci kaspázových proteáz. Buňky kultivované ve standardním médiu bez 2OH3MeOBAPR (bílý sloupec), buňky kultivované v médiu obsahujícím 20 μM 2OH3MeOBAPR (černý sloupec). Relativní hydrolýza substrátu pro kaspázu-9 Ac-LEHD-AFC a) a kaspázu-3 Ac-DEVD-AMC b).

Obr. 10 znázorňuje vliv kaspázového inhibitoru Z-VAD-FMK na viabilitu buněk HL-60 kultivovaných v přítomnosti iPA. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 20 μM 2OH3MeOBAPR (bílý sloupec) a 20 μM 2OH3MeOBAPR v kombinaci s 50 μM Z-VAD-FMK (černý sloupec) a buňky byly kultivovány 72h. V průběhu inkubace byla stanovována viabilita buněk pomocí kombinovaného barvení FDA/PI.

Na obr. 11 je znázorněn vliv inhibitoru adenosin kinázy 4-amino-3-iodo-1 β -D-ribofuranosylpyrazolo [3,4-d]-pyrimidine (AIRPP), na viabilitu buněk HL-60 kultivovaných v přítomnosti iPA. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 20 μM 2OH3MeOBAPR (bílý sloupec) a 20 μM 2OH3MeOBAPR v kombinaci s 1 μM AIRPP (černý sloupec) a buňky byly kultivovány 72h. V průběhu inkubace byla stanovována viabilita buněk pomocí kombinovaného barvení FDA/PI.

Obr. 12 znázorňuje vliv nových cytokininů na retenci chlorofylu v extirpovaných listových segmentech pšenice. Prezentované hodnoty jsou vyjádřeny v % výchozího obsahu chlorofylu v čerstvých listech před inkubací s cytokininy. Přerušovaná čára představuje kontrolní měření bez přítomnosti cytokininů, tj. $57,7 \pm 0,9$.

Na obr. 13 je znázorněn vliv nových cytokininů na růst cytokinin-dependentního kalusu tabáku. Přímka —●— představuje kontrolní měření bez přítomnosti cytokininů, tj. $2,5 \pm 0,3$ g.

Na obr. 14 je znázorněn vliv nových cytokininů na syntézu betacyaninu v kotyledonárních/hypokotylárních explantátech *Amaranthus caudatus*. Prezentované hodnoty představují rozdíly v jednotkách O.D. mezi absorbancí při 537 a 620 nm.

Obr. 15 ukazuje relativní počet explantátů s alespoň jedním hnědým listem v závislosti na čase (■: BAP, ●: mT, ▲: mMeOBAPR). Obr. 16. Relativní počet uhynulých explantátů v závislosti na čase (■: BA, ●: mT, ▲: mMeOBAPR).

Obr. 16 ukazuje relativní počet uhynulých explantátů v závislosti na čase (■: BA, ●: mT, ▲: mMeOBAPR).

Na obr. 17 je znázorněn vlevo: uhynulý explantát *Rosa hybrida* na mediu obsahujícím BAP; vpravo: zdravý explantát *Rosa hybrida* na mediu s mMeOBAPR po 121 dnech kultivace.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

3 mmol 6-chloropurin ribosidu byly rozpuštěny v 15 ml butanolu a byly přidány 4 mmoly 2,3,6-trifluorbenzylaminu a 5 mmolů triethylaminu. Roztok byl zahříván na 90 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení byl surový produkt odfiltrován a rekrystalován v etanolu. B.t. 196°C. TLC: chloroform-metanol-amoniak (90:9:0,1). Výtěžek 92 %.

Tabulka 1

Látky připravené způsobem podle příkladu 1

Substituent	Elementární analýza				
	Vypočteno/nalezeno				
	%C	%H	%N	ES-MS [M+H ⁺]	Bod tání (°C)
2-fluorobenzylamino	54,4/54,1	4,8/4,8	18,7/18,4	376	191-192
3-fluorobenzylamino	54,4/53,9	4,8/4,7	18,7/18,2	376	153-154
4-fluorobenzylamino	54,4/54,3	4,8/4,8	18,7/18,3	376	177-178
2-chlorobenzylamino	52,1/52,0	4,6/4,7	17,9/17,5	392	183-184
3-chlorobenzylamino	52,1/51,9	4,6/4,6	17,9/17,3	392	164-165
4-chlorobenzylamino	52,1/51,8	4,6/4,5	17,9/17,1	392	181-182
2-bromobenzylamino	46,8/46,3	4,16/4,1	16,05/15,5	436	180-181
3-bromobenzylamino	46,8/47,8	4,16/4,5	16,05/15,6	436	173-174
4-bromobenzylamino	46,8/46,9	4,16/4,3	16,05/15,4	436	175-176
3-jodobenzylamino	41,0/41,4	2,8/2,8	20,0/19,5	484	184-185
2-methylbenzylamino	58,2/57,88	5,7/5,5	18,86/18,3	372	174-175
3-methylbenzylamino	58,2/57,9	5,7/5,44	18,86/18,2	372	162-163
4-methylbenzylamino	58,2/58,5	5,7/5,9	18,86/18,3	372	164-166
2-methoxylbenzylamino	55,8/54,95	5,46/5,2	18,1/17,73	388	164-166
3-methoxylbenzylamino	55,8/55,5	5,46/5,7	18,1/17,96	388	162-163

4-methoxybenzylamino	55,8/55,33	5,46/5,2	18,1/17,7	388	154-156
2,4-dichlorobenzylamino	47,9/47,98	4,0/4,03	16,4/15,9	426	205-206
3,4-dichlorobenzylamino	47,9/47,3	4,0/4,3	16,4/16,12	426	194-195
2,3-dihydroxybenzylamino	52,4/52,1	4,9/5,0	18,0/18,2	390	184-186
3,5-dihydroxybenzylamino	52,4/52,2	4,9/5,2	18,0/17,6	390	187-188
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	53,6/54,0	5,2/5,4	17,4/17,1	404	208-209
3-hydroxy-4-methoxybenzylamino	53,6/53,1	5,2/5,6	17,4/17,0	404	218-219
2,3-dimethoxybenzylamino	54,7/54,8	5,6/5,5	16,8/16,4	418	177-179
2,4-dimethoxybenzylamino	54,7/54,3	5,6/5,7	16,8/16,3	418	208-210
3,4-dimethoxybenzylamino	54,7/54,45	5,6/5,5	16,8/16,3	418	156-157
3,5-dimethoxybenzylamino	54,67/54,7	5,6/5,5	16,8/16,4	418	174-175
4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylamino	52,6/52,5	5,3/5,2	16,2/16,3	434	200-201
2,4-difluorobenzylamino	51,9/51,4	4,4/4,3	17,8/17,7	394	171-172
3,5-difluorobenzylamino	51,9/ 51,2	4,4/4,3	17,8/17,6	394	178-178
2,3,4-trifluorobenzylamino	49,6/49,1	3,9/3,7	17,0/16,8	412	192-193
2,4,5-trifluorobenzylamino	49,6/49,0	3,9/3,8	17,0/16,4	412	175-176
2,3,6-trifluorobenzylamino	49,6/49,0	3,9/3,7	17,0/16,4	412	195-196
3-chloro-4-fluorobenzylamino	49,8/49,2	4,2/4,1	17,1/16,8	411	148-149

Příklad 2

3 mmol 6-chloropurin ribosidu byly rozpuštěny v 15 ml butanolu a byly přidány 4 mmoly 2-hydroxy-3-methoxybenzylaminu a 5 mmolů diisopropylethylaminu. Roztok byl zahříván na 60 °C po dobu 18 hodin. Po ochlazení byl surový produkt odfiltrován a rekrystalován v etanolu. B.t. 209°C. TLC: chloroform-metanol-amoniak (90:9:0,1). Výtěžek 92 %.

Tabulka 2

Látky připravené způsobem podle příkladu 2

Substituent	Elementární analýza				
	Vypočteno/nalezeno				
	%C	%H	%N	ES-MS [M+H ⁺]	Bod tání (°C)
2-methoxylbenzylamino	55,8/55,5	5,5/5,7	18,1/18,3	388	165-166
3-methoxylbenzylamino	55,8/55,5	5,46/5,7	18,1/17,96	388	163-164
4-methoxylbenzylamino	55,8/55,33	5,46/5,2	18,1/17,7	388	156-157
2,3-dimethoxybenzylamino	54,7/54,5	5,6/5,7	16,8/17,0	418	178-179
2,4-dimethoxybenzylamino	54,7/54,4	5,6/5,7	16,8/16,9	418	209-210
3,4-dimethoxybenzylamino	54,7/54,5	5,6/5,5	16,8/16,3	418	157-158
3,5-dimethoxybenzylamino	54,7/54,7	5,6/5,5	16,8/16,4	418	176-177
2-hydroxy-3- methoxybenzylamino	53,6/53,3	5,2/5,3	17,4/17,6	404	209-211
3-hydroxy-4- methoxybenzylamino	53,6/53,3	5,2/5,4	17,4/17,6	404	219-220
4-hydroxy-3,5- dimethoxybenzylamino	52,6/52,4	5,3/5,4	16,2/16,3	434	202-203

Příklad 3

3 mmoly 6-fluorpurin ribosidu byly rozpuštěny v 15 ml isopropanolu a bylo přidáno 8 mmolů 2,3-dihydroxybenzylaminu hydrobromidu a 10 mmolů triethylaminu. Roztok byl zahříván na 60 °C po dobu 6 hodin. Po ochlazení byl surový produkt odfiltrován a rekrystalován v etanolu. B.t. 196 °C. TLC: chloroform-metanol-amoniak (90:9:0,1). Výtěžek 89 %.

Tabulka 3
Látky připravené způsobem podle příkladu 3

Substituent	Elementární analýza			
	Vypočteno/nalezeno			
	%C	%H	%A	ES-MS [M+H ⁺]
2,3-dihydroxybenzylamino	52,4/52,2	4,9/5,0	18,0/18,2	390
3,5-dihydroxybenzylamino	52,4/52,2	4,9/5,0	18,0/17,8	390
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	53,6/53,9	5,2/5,3	17,4/17,2	404
3-hydroxy-4-methoxybenzylamino	53,6/53,3	5,2/5,4	17,4/17,2	404
2,3-dimethoxybenzylamino	54,7/54,8	5,6/5,5	16,8/16,6	418
2,4-dimethoxybenzylamino	54,7/54,3	5,6/5,7	16,8/16,5	418
3,4-dimethoxybenzylamino	54,7/54,5	5,6/5,5	16,8/16,5	418
3,5-dimethoxybenzylamino	54,7/54,7	5,6/5,5	16,8/16,6	418
4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylamino	52,6/52,3	5,3/5,2	16,2/16,4	434

Příklad 4

2-chloro-6-(3-methoxybenzylamino)purin ribosid

3 mmol 2,6-dichloropurin ribosidu byly rozpuštěny v 15 ml butanolu a byly přidány 4 mmoly 3-methoxybenzylaminu a 5 mmolů triethylaminu. Roztok byl zahříván na 90 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení byl surový produkt odfiltrován a rekrystalován v etanolu. TLC: chloroform-metanol-amoniak (90:9:1). Výtěžek 85 %.

Tabulka 4
Látky připravené způsobem podle příkladu 4

Substituent ($R_2=Cl$)	Elementární analýza vypočteno/nalezeno			ES-MS [M+H ⁺]
	%C	%H	%A	
2-methylbenzylamino	53,3/52,8	5,0/5,2	17,3/17,6	406
3-methylbenzylamino	53,3/52,7	5,0/5,3	17,3/17,8	406
4-methylbenzylamino	53,3/52,9	5,0/5,2	17,3/17,6	406
2-methoxybenzylamino	51,2/50,6	4,8/5,0	16,6/16,9	422
3-methoxybenzylamino	51,2/50,9	4,8/4,9	16,6/17,0	422
4-methoxybenzylamino	51,2/50,7	4,8/5,0	16,6/16,9	422
2,3-dimethoxybenzylamino	50,5/50,0	4,9/4,7	15,5/15,8	452
2,4-dimethoxybenzylamino	50,5/50,2	4,9/4,9	15,5/15,6	452
3,4-dimethoxybenzylamino	50,5/49,7	4,9/4,5	15,5/16,1	452
3,5-dimethoxybenzylamino	50,5/50,2	4,9/4,7	15,5/15,8	452

Příklad 5

2-amino-6-(2-methoxybenzylamino)purin ribosid

3 mmol 2-amino-6-chloropurinu ribosidu byly rozpuštěny v 15 ml butanolu a byly přidány 4 mmoly 3-methoxybenzylaminu a 5mmolů triethylaminu. Roztok byl zahříván na 90 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení byl surový produkt odfiltrován a rekrystalován v etanolu. TLC: chloroform-metanol-amoniak (90:9:1). Výtěžek 86 %.

Tabulka 5
Látky připravené způsobem podle příkladu 5

Substituent (R ₂ =NH ₂)	Elementární analýza			ES-MS [M+H ⁺]
	Vypočteno/nalezeno			
	%C	%H	%A	
2-methylbenzylamino	56,0/55,4	5,7/5,9	16,6/16,9	387
3-methylbenzylamino	56,0/55,6	5,7/5,7	16,6/16,9	387
4-methylbenzylamino	56,0/55,6	5,7/5,8	16,6/16,7	387
2-methoxybenzylamino	53,7/53,1	5,5/5,7	20,9/21,2	403
3-methoxybenzylamino	53,7/53,2	5,5/5,7	20,9/21,3	403
4-methoxybenzylamino	53,7/53,3	5,5/5,6	20,9/21,2	403
2,3-dimethoxybenzylamino	52,8/52,4	5,6/5,7	19,4/19,6	403
2,4-dimethoxybenzylamino	52,8/52,5	5,6/5,7	19,4/19,6	433
3,4-dimethoxybenzylamino	52,8/52,0	5,6/6,0	19,4/19,9	433
3,5-dimethoxybenzylamino	52,8/52,1	5,6/5,9	19,4/19,9	433

Příklad 6

Inhibice senescence živočišných buněk

V tomto příkladě, lidské diploidní fibroblasty (HCA buňky s rozdílnou úrovní pasážování: pasáž 25 - označení HCA25; pasáž 45 - označení HCA45; pasáž 80 - označení HCA80) byly použity pro studium β -galactosidasové aktivity. Medium použité pro kultivaci buněk bylo odstraněno, buňky byly promyty 2-krát PBS a fixovány ve 2-3 ml fixačního činidla skládajícího se ze 2% formaldehydu a 0.2% glutaraldehydu v PBS. Buňky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5 min. a poté 2-krát promyty PBS. Buňky byly pak inkubovány při 37 °C (bez CO₂) po dobu 1 až 16 hodin ve 2-3 ml roztoku obsahujícího ferrikyanid draselný (5 mM), ferrokyanid draselný (5 mM), MgCl₂ (2 mM), X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) (1 mg/ml), v citrát/fosfátovém pufru, pH 6.0) Po této inkubační periodě byly buňky pozorovány mikroskopicky za účelem zjištění senescenčních buněk anebo měření intenzity zabarvení

při 415 nm spektrofotometricky pomocí readeru Multiscam MCC (Labsystems) (pozitivně senescentní buňky). V těchto experimentech byly označeny pouze senescentní buňky a to díky účinku β -galaktosidasy na substrát.

Tabulka 6

Vliv nových sloučenin na počet senescenčních buněk v kultuře lidských fibroblastů.

SUBSTITUENT	SENESCENTNÍ BUŇKY (%)		
	HCA25	HCA45	HCA80
R6			
KONTROLA	3	5	38
Kinetin	3	5	25
3-chloroanilino	4	4	27
Anilino	4	5	25
3-chloro-5-aminoanilino	4	5	23
4-bromoanilino	5	5	21
4-chloroanilino	4	6	25
3-amino-4-chloroanilino	3	5	24
2-methoxybenzylamino	4	4	16
3-methoxybenzylamino	5	6	12
2,3-dimethoxybenzylamino	4	5	18
2-methoxy-3-chlorobenzylamino	4	5	18
2-fluorobenzylamino	4	4	15
3-fluorobenzylamino	3	5	13
3-amino-4-chlorobenzylamine	4	6	22
2,3-diamino-4-chlorobenzylamine	3	4	19

Jak je ukázáno tabulce 6 se vzrůstajícím počtem pasáží vrůstala hladina zabarvení po přidání substrátu pro β -glukosidasu. U nejstarších kultur bylo možné pozorovat pouze modře zabarvené buňky jejichž barva se nacházela v rozmezí od jasně modré po matně modrou. N⁶-substituované deriváty adenosinu byly velmi účinné při zpomalování senescence buněk po 80

pasáži. V případě dlouhodobější kultivace byly schopny přežít až o 40% delší dobu oproti buňkám kontrolním.

Příklad 7

2-methylthio-6-(3-methylbenzylamino)purin ribosid

2-Methylthioxanthin (65 g) byl převrstven oxychloridem fosforečným (975 ml) a N,N-diethylanilinem (97.5 ml). Směs byla refluxována 1,5 h za stálého míchání. Veškerý nadbytek oxychloridu fosforečného byl odpařen pod vakuem (vakuová odparka, vodní vývěva) a zbytek smíchán s ledem (1.75 kg) v 10 l nádobě (bez dalšího chlazení). Směs byla ještě 10 min. míchána (dokončení hydrolýzy oxychloridu) a následně extrahována ethyl-acetátem (4 x 2.5 l). Spojené extrakty byly promyty vodou (3 x 1 l) a vysušeny. Surový produkt byl rekrystalizován z ethanolu a vysušen do konstantní hmotnosti nad oxidem fosforečným. Výtěžek 23.6 g (33%). UV čistota 99%. HPLC (25 x 0.4 cm ODS. Od 0 do 30% acetonitrilu. 1 ml/min. 30 min) tR 26.8 min. Čistota 92%. TLC (chloroform/methanol. 9/1) Rf 0.80

2-Methylthio-6-chlorpurin (4 g, vysušen do konstantní hmotnosti nad oxidem fosforečným) byl smíchán s β -D-ribofuranosou 1,2,3,5-tetra acetátem (6.4 g) při teplotě 145 – 150°C v parafinové lázni. Bylo přidáno asi 100 mg jodu a směs sušena pod vodní vývěvou asi 30 min. Černý zbytek byl rozpuštěn v chloroformu, zfiltrován a nanesen ve 100ml směsi ethyl acetát/toluen (1:4) na kolonu naplněnou 2 x 400 g silikagelu ve 2 l 20% ethyl acetátu v toluenu. Kolona byla následně eluována 30% ethyl acetátem v toluenu. Složení frakcí bylo monitorováno pomocí TLC v mobilní fázi ethyl acetát/toluen 1/2 (výchozí látka Rf = 0.06, produkt 0.25). Hlavní produkt (71%), β isomer, byl zcela separován od α isomeru a dalších nečistot. Hnědý sirup byl vysušen pod vakuem a rozpuštěn v suchém methanolu, ochlazen a deacetylován přes noc v 1000 ml bezvodého methanolu nasyceného čpavkem. Směs byla odpařena na rotační vakuové odparce a produkt byl rekrystalizován v horké vodě za vzniku žlutých krystalů a vysušen do konstantní hmotnosti nad P_2O_5 . Výtěžek 4.95 g (18.6 %). B. t. 187-188 °C. HPLC čistota (25cm ODS 0 - 30% acetonitrilu) = 91%.

3.3 g (10 mmol) 2-methylthio-6-chlorpurinu- β -D-ribofuranosidu bylo přidáno do směsi 3-methylbenzylaminu v butanolu (100 ml) obsahujícího triethylamin (7.8 ml) a směs byla refluxována 2 hodiny. Butanol byl odpařen za zisku bílého produktu, který byl následně resuspendován ve vodě (50 ml). pH suspence bylo adjustováno na 8 - 8.5 pomocí 2 M NaOH a uchováváno přes noc při 4 °C. Pevný produkt byl odfiltrován a rekrystalizován z horkého

ethanolu za vzniku bílého produktu, který byl následně vysušen nad P_2O_5 do konstantní hmotnosti. Výtěžek 3.1 g. (81.4%). HPLC čistota 98.6%.

Tabulka 7

Látky připravené způsobem podle příkladu 7

Substituent (R_2 =methylthio)	Elementární analýza Vypočteno/nalezeno			ES-MS [$M+H^+$]
	%C	%H	%A	
2-methylbenzylamino	58,9/58,2	5,3/5,6	24,5/24,8	286
3-methylbenzylamino	58,9/58,4	5,3/5,6	24,5/24,8	286
4-methylbenzylamino	58,9/58,1	5,3/5,9	24,5/25,0	286
2-methoxybenzylamino	55,8/55,0	5,0/5,4	23,2/23,8	302
3-methoxybenzylamino	55,8/55,5	5,0/5,1	23,2/23,3	302
4-methoxybenzylamino	55,8/55,3	5,0/5,3	23,2/23,6	302

Příklad 8

Indukce proteinu p21^{WAF-1}, přirozeného inhibitoru cyklin-dependentních kináz, působením cytokininů v buněčné linii karcinomu prsu MCF-7 – molekulární mechanismus účinku.

Změny hladiny proteinu p21^{WAF-1} v závislosti na koncentraci 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosidu (2OH3MeOBAPR)

Na buňky MCF-7 kultivované při 37 °C v atmosféře s 5% CO_2 v médiu D-MEM s přidavkem 10% fetálního telecího séra působily koncentrace 2OH3MeOBAPR v rozmezí 0-100 μ M. 2OH3MeOBAPR byl do média přidáván ze 100mM zásobního roztoku v DMSO. Po 12 hodinách byly buňky sklizeny seškrabáním do média, centrifugovány (1000rpm, 4°C, 5min), 2x promyty ledovým PBS a následně opět centrifugovány. Následovala lyze buněk 1x CSB (nanášecí pufr pro SDS-PAGE, tj. elektroforézu proteinů v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS). Proteiny v lyzátu byly separovány SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Membrána byla zablokována roztokem 5% odtučněného mléka +

0.1% Tween 20 v PBS. Hladina proteinů p21^{WAF-1} a aktin (jako kontrola nanášeného množství proteinu) byla sledována imunochemicky pomocí komerčně dostupných specifických monoklonálních protilátek Anti-WAF1 (Ab-1, Calbiochem) a Anti-Actin (Clone AC-40, Sigma-Aldrich). Pro detekci navázaných protilátek byla použita králičí sekundární protilátka značená peroxidázou (RAM-Px, DAKO) s následnou chemiluminiscencí (ECL, Amersham-Pharmacia). Účinné indukce proteinu p21^{WAF-1} je v buňkách MCF-7 dosaženo působením koncentrací 2OH3MeOBAPR v řádu jednotek μmol na litr kultivačního média (Obr. 1).

Změny hladiny proteinu p21^{WAF-1} v závislosti na době inkubace s 2OH3MeOBAPR

Buňky MCF-7 byly inkubovány v přítomnosti 1 μM 2OH3MeOBAPR. V různých časových intervalech od podání 2OH3MeOBAPR byly buňky sklizeny a lyzovány. Následná SDS-PAGE a imunodetekce umožnila stanovení změn hladiny proteinu p21^{WAF-1} v závislosti na délce inkubace v přítomnosti 2OH3MeOBAPR. Kultivace buněk, jejich sklizení, lyze a detekce proteinů p21^{WAF-1} a aktin v lyzátech probíhala obdobně jako v bodě 1. K účinné indukci p21^{WAF-1} v buňkách MCF-7 dochází v rozmezí 6-24 hodin po přidavku 2OH3MeOBAPR v 1 μM koncentraci (Obr.2).

Příklad 9

In vitro cytotoxická aktivita nových derivátů

Jedním z parametrů používaných jako základ pro cytotoxickou analýzu je metabolická aktivita životaschopných buněk. Například mikrotitrační analýza, kde se používá Calcein AM, je dnes rozšířena jako metoda kvantifikace buněčné proliferace a cytotoxicity. Tento test je využíván v programech pro screening léků a pro testy chemosensitivity. Testem se rozpoznají pouze životaschopné buňky. Množství zredukovaného Calceinu AM odpovídá počtu životaschopných buněk v kultuře.

Lidská T-lymfoblastická leukemická buněčná linie CEM, promyelocytární HL-60 a monocytární U937 leukemie, buněčné linie prsního karcinomu MCF-7, buňky cervikálního karcinomu HELA, myši fibroblasty NIH3T3, lidská erythroleukemie K562, buňky G361 lidského maligního melanomu byly použity pro rutinní screening sloučenin. Buňky byly udržovány v Nunc/Corning 80 cm² plastických lahvích a pěstovány v mediu pro buněčné kultury (DMEM obsahující 5g/l glukózy, 2mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný), sloučeniny byly připraveny postupem podle předloženého vynálezu.

Buněčné suspenze byly připraveny a naředěny podle typu buněk a podle očekávané konečné hustoty buněk (10^4 buněk na jamku na základě charakteristik buněčného růstu), pipetovalo se 80 μ l buněčné suspenze na 96-jamkové mikrotitrační destičky. Inokuláty byly stabilizovány 24 hodinovou preinkubací při 37 °C v atmosféře CO₂. Jednotlivé koncentrace testovaných látek byly přidány v čase nula jako 20 μ l alikvotní podíl do jamek mikrotitračních destiček. Obvykle se sloučeniny ředily do šesti koncentrací v čtyřnásobné ředící řadě. Při rutinním testování byla nejvyšší koncentrace v jamce 166.7 μ M, změny této koncentrace závisí na dané látce. Všechny koncentrace byly testovány v dubletu. Inkubace buněk s testovanými deriváty trvala 72 hodin při 37 °C, 100 % vlhkosti a v atmosféře CO₂. Na konci inkubační periody byly buňky analyzovány po přidání roztoku Calceinu AM (Molecular Probes) a inkubace probíhala další 1 hodinu. Fluorescence (FD) byla měřena pomocí Labsystem FIA readeru Fluoroskan Ascent (Microsystems). Přežití nádorových buněk (The tumor cell survival-TCS) bylo spočítáno podle následujícího vztahu: $GI_{50} = (FD_{\text{jamka s derivátem}} / FD_{\text{kontrolní jamka}}) \times 100 \%$. Hodnota GI_{50} , která odpovídá koncentraci látky, kdy je usmrceno 50 % nádorových buněk, byla vypočtena ze získaných dávkových křivek (Obr. 3).

Pro vyhodnocení protinádorové aktivity byla testována toxicita nových derivátů na panelech obsahujících buněčné linie rozdílného histogenetického a druhového původu (Tab. 8). Ukázalo se, že pro všechny testované nádorové linie bylo působení nových sloučenin, kdežto nemaligní buněčné linie, tzn. NIH3T3 fibroblasty a normální lidské lymfocyty, byly vůči tomuto působení rezistentní. Účinné deriváty zabily nádorové buňky při koncentracích blízkých 0.1-50 μ M.

Tabulka 8

Cytotoxicita N⁶-substituovaných derivátů adenosinu pro různé nádorové buňky

Substituent v poloze N ⁶ -adenosinu	Použitá buněčná linie / IC 50 (μ mol/L)						
	HOS	K-562	MCF7	NIH-3T3	G-361	CEM	HL60
Adenosin	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
ZR	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
2-hydroxybenzylamino	2.8	88	11.4	43.2	>166,7	0.7	0.42
3-hydroxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	51.9	23.7
4-hydroxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	39.7	9.5
2-methoxybenzylamino	21.2	11.2	>166,7	>166,7	>166,7	3.2	2.3

3-methoxyxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	7.6	4.9
4-methoxyxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	114.9	>166,7	>166,7
2-chlorobenzylamino	>166,7	64	>166,7	>166,7		14.5	1.6
3-chlorobenzylamino	>166,7	30.4	>166,7	>166,7		1.6	0.75
4-chlorobenzylamino	>166,7	16.1	>166,7	>166,7		6.5	5.3
2-fluorobenzylamino	>166,7	33.2	>166,7			4.6	3.2
3-fluorobenzylamino	>166,7	7	16.6	>166,7	15.7	4	0.92
4-fluorobenzylamino	20	6.4	14	>166,7		1.5	0.86
2-methylbenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		14	3.3
3-methylbenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		19.1	6.4
4-methylbenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		>166,7	>166,7
2-bromobenzylamino	>166,7	10	>166,7	>166,7		12.3	6.6
3-bromobenzylamino	>166,7	19.7	>166,7	>166,7		5	8
4-bromobenzylamino	>166,7	68.2	>166,7	>166,7		20.6	47.4
2,4-dimethoxyxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		>166,7	39
2-chloro-4-fluorobenzylamino	>166,7	11.7	>166,7	>166,7		20.9	9
3-chloro-4-fluorobenzylamino	>166,7	4.1	>166,7	>166,7		3.4	3.5
2,3-dimethoxyxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		>166,7	109
2,4-dichloroxybenzylamino	>166,7	85.7	126.9	>166,7		86.7	96.3
2,4-difluororoxxybenzylamino	>166,7	7.4	>166,7	>166,7		7.1	3.4
2,3,4-trifluororoxxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		58.2	13
3,4-dichloroxybenzylamino	>166,7	6.5	88.8	>166,7		3	1.1
3,5-difluororoxxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		24.5	9.1
3,5-dimethoxyxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7			18.8
2,3,6-trifluororoxxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7			13
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	>166,7	19.2	27	>166,7	148.1	0.3	0.15
3-hydroxy-4-methoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		>166,7	>166,7
2-hydroxy-5-methoxybenzylamino	>166,7	15.4	21	>166,7	102.3	0.2	0.1
2-hydroxy-3-chlorobenzylamino	>166,7	10.7	15	>166,7	128.5	0.3	0.1
R2=Cl, Substituent v N⁶-poloze							
2-hydroxybenzylamino	2.5	75	10.5	35.1	>166,7	0.56	0.38
3-hydroxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	47.8	15.9
4-hydroxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	39.7	9.5
2-methoxyxybenzylamino	15.3	14.5	>166,7	>166,7	>166,7	2.7	1.5
3-methoxyxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	6.5	4.1
4-methoxyxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	105.4	>166,7	>166,7
2-chlorobenzylamino	>166,7	61	>166,7	>166,7		8.5	1.2
3-chlorobenzylamino	>166,7	28	>166,7	>166,7		1.1	0.6
4-chlorobenzylamino	>166,7	15	>166,7	>166,7		5.8	5.0

2-fluorobenzylamino	>166,7	30	>166,7			4.2	2.5
3-fluorobenzylamino	>166,7	5.3	16	>166,7	16	3	0.9
4-fluorobenzylamino	19	5.8	12	>166,7		1.5	0.7
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	>166,7	17	23	>166,7	140	0.2	0.1
2-hydroxy-3-chlorobenzylamino	>166,7	10	14	>166,7	118	0.2	0.1
R2=NH2, Substituent v N⁶-poloze							
2-methoxyxybenzylamino	27.8	34.9	>166,7	>166,7	>166,7	12.8	7.8
3-methoxyxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	13.8	8.9
2-chlorobenzylamino	>166,7	78	>166,7	>166,7		24.7	10.3
3-chlorobenzylamino	>166,7	43	>166,7	>166,7		10.2	5.8
2-fluorobenzylamino	>166,7	45	>166,7			14.5	8.7
3-fluorobenzylamino	>166,7	12	36	>166,7	21	21	3.4
4-fluorobenzylamino	43	13	25	>166,7		12.1	2.9
R2=SCH₃, Substituent v N⁶-poloze							
2-methoxyxybenzylamino	34.3	34.8	>166,7	>166,7	>166,7	11.5	10.2
3-methoxyxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	16.5	8.8
2-chlorobenzylamino	>166,7	78	>166,7	>166,7		14.6	7.4
3-chlorobenzylamino	>166,7	35	>166,7	>166,7		13.2	6.1
2-fluorobenzylamino	>166,7	42	>166,7			9.7	11.4
3-fluorobenzylamino	>166,7	7.9	31	>166,7	28	8.5	5.2

Příklad 10

Nové sloučeniny indukují apoptózu nádorových buněk

Pro analýzu mechanismu indukované cytotoxicity nových sloučenin je důležité odlišit apoptózu od druhé hlavní formy buněčné smrti, nekrózy. Zaprvé, na úrovni tkáně apoptóza produkuje malý nebo žádný zánět, protože okolní buňky, zvláště makrofágy, spíše než že jsou uvolněny do extracelulární tekutiny, pohltní jednotlivé části buňky. Naproti tomu při nekróze je buněčný obsah uvolněn do extracelulární tekutiny, což způsobuje zánět. Zadruhé, na buněčné úrovni vykazují apoptoické buňky smršťování a blebbing (puchýřkování) cytoplasmy, zachování struktury buněčných organel včetně mitochondrií, kondenzaci chromatinu, fragmentaci jádra a tvorbu apoptoických tělísek, ačkoli ne všechny jsou vidět u všech typů buněk. Zatřetí, na molekulární úrovni hraje významnou roli v indukci apoptózy řada biochemických procesů. Většina z nich však není dobře pochopena a mají za následek aktivaci proteáz a nukleáz, které nakonec ničí klíčové biologické makromolekuly - proteiny a DNA.

Kultivace buněk. Suspenze lidských leukemických buněk, linie HL-60 byla kultivována v médiu RPMI-1640 doplněném 10% telecím fetálním sérem a antibiotiky v atmosféře 5% CO₂ při 37 °C. Počet buněk je stanoven pomocí hemocytometru. Buňky byly získány z ECACC.

Viabilita buněk. Buňky jsou barveny kombinací fluorescein diacetátu (FDA, 2 µg/ml) a propidium jodidu (PI, 10 µg/ml) přímo v růstovém médiu. Rozlišování živých a mrtvých buněk se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu (Mlejnek and Kolman. *Chem. Biol. Interact.* 1999, 117: 219-239).

Morfologická analýza buněčných jader. Buňky jsou promyty v PBS a pak fixovány ve směsi methanol/kyselina octová (3:1) při -20 °C po dobu 12 hodin. Fixované buňky jsou nakapány na podložní sklička a barveny Hoechst 33342 (2 µg/ml) v PBS/glycerol (v/v 70:30). Morfologie buněčných jader je pozorována pod fluorescenčním mikroskopem Olympus BX60, (Mlejnek and Kuglík 2000).

Analýza buněčného cyklu. Buňky jsou promyty v PBS a pak fixovány v 70% etanolu při -20°C přes noc. Fixované buňky jsou promyty v PBS, a pak barveny v roztoku PBS obsahujícího propidium jodid PI (20 µg/ml) a RNase A (100 µg/ml) po dobu 30 min při teplotě místnosti. Obarvené buňky jsou dále analyzovány průtokovou cytometrií (FACScan, Becton Dickinson), (Mlejnek and Kolman 1999).

Měření integrity jaderné DNA. Vzorky buněk jsou promyty v PBS a pak lyzovány v pufru (50 mM Tris/ HCl, pH = 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% sarkosinátu sodném, 0.5 mg/ml proteinázy K a 0.2 mg/ml RNáza A) po dobu 12 hodin při 37 °C. DNA extrakty jsou pak analyzovány standardní agarózovou elektroforézou (Mlejnek, and Kuglík. *J. Cell. Biochem.* 2000, 77: 6-17).

Měření obsahu nukleotidů pomocí HPLC. Asi 10⁷ buněk je sedimentováno centrifugací (2500 ot/min, 3 min. při lab. teplotě). Sedimenty jsou extrahovány 5% HClO₄ po dobu 15 min. při 4°C. Buněčné extrakty jsou neutralizovány přidavkem 2 M K₂CO₃. Alikvoty extraktů jsou naneseny na kolonu µBONDAPAK C₁₈ (250 x 4 mm, 5 µm) a nukleotidy jsou eluovány za izokratických podmínek: mobilní fáze - 0.1M NaH₂PO₄, pH=6.4, 5mM tetrabutylamonium phosphate + 10% acetonitril, průtok - 0.4 ml/min. Kvantitativní analýza byla provedena pomocí externího standardu ATP, iPA a iPA monofosfátu (Mlejnek, and Kuglík. *J. Cell. Biochem.* 2000, 77: 6-17).

Měření aktivit kaspázových proteáz. Buňky jsou promyty v PBS a pak lyzovány

v kaspázovém extrakčním pufru [50 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2% Chaps, 5 mM dithiothreitol, a směs inhibitorů proteáz (Roche)] po dobu 15 min. při 4 °C. Lyzáty jsou odstředěny (30 000 x g při 4°C po dobu 30 min.). Supernatant je možno ihned použít pro měření nebo uschovat při -80 °C. Měření aktivit se provádí se syntetickými fluorescenčními substráty. Aktivita kaspázy-1, a 3 byly měřeny se substráty Ac-YVAD-AMC a Ac-DEVD-AMC při 380/445 nm v reakčním pufru (25 mM PIPES/KOH, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, and 5 mM DTT, pH 7.3). Aktivita kaspázy-9 pak se substrátem Ac-LEHD-AFC při 400/500 nm ve stejném reakčním pufru, avšak při pH = 6.6 (Mlejnek. J. Cell. Biochem. 2001, 83: 678-689).

Výsledky

6-(2-hydroxy-3-methoxybenzyl)amino-purin ribosid (2OH3MeOBAPR) a další příbuzné cytokininové deriváty zpomaluje buněčnou proliferaci (Obr. 4) a indukuje buněčnou smrt u buněk HL-60, jež nese typické morfologické a biochemické znaky apoptozy (Obr. 5-7). Analýza buněčného cyklu ukazuje, že 2OH3MeOBAPR neinhibuje buněčný cyklus v některém z kontrolních bodů, ale více méně nespecificky (Obr. 8). Působení 2OH3MeOBAPR indukuje aktivaci kaspázových proteáz, zejména kaspázu-9 a -3 (Obr. 9). Inhibicí kaspázových proteáz nelze zabránit buněčné smrti. Nespecifický kaspázový inhibitor Z-VAD-FMK potlačuje morfologické i biochemické apoptotické znaky, avšak neinhibuje buněčnou smrt jako takovou (Obr. 10). 2OH3MeOBAPR není toxické pro buňky sám o sobě, toxické jsou pouze jeho fosforylované deriváty. Inhibitory adenosin kinázy, které zabrání intracelulární konverzi 2OH3MeOBAPR na 2OH3MeOBAPR monofosfát úplně potlačí nástup apoptozy včetně všech jejích morfologických i biochemických znaků (Obr. 11).

Příklad 11

Imunosupresivní aktivita

Jedním z důležitých parametrů specifické buněčné imunity je odezva lymfocytů na antigeny nebo polyklonální mitogeny. Většina normálních savčích periferních lymfocytů je v klidové fázi buněčného cyklu. Antigeny i nespecifické polyklonální mitogeny mají schopnost aktivovat lymfatické buňky, což je doprovázeno dramatickými změnami ve vnitrobuněčném metabolismu (mitochondriální aktivita, proteinová syntéza, syntéza nukleových kyselin, formování blastů a buněčná proliferace). Sloučeniny, které jsou schopné selektivně inhibovat proliferaci lymfocytů, jsou potenciálními imunosupresivy. Pro měření proliferační odpovědi

lymfocytů bylo vyvinuto množství *in vitro* analýz. Nejběžněji používanou metodou je inkorporace ^3H -thymidinu.

Během buněčné proliferace dochází nejprve k replikaci DNA, poté je buňka rozdělena na dvě dceřinné buňky. Tento úzký vztah mezi buněčným zdvojením a DNA syntézou poskytuje možnost pro vyhodnocení intenzity buněčné proliferace. Jestliže jsou značené DNA prekursor přidány do buněčné kultury, dělicí se buňky inkorporují značené nukleotidy do své DNA. Tyto testy obvykle vyžadují použití radioaktivně značených nukleotidů, konkrétně tritiovaný thymidin (^3H -TdR). Množství ^3H -TdR inkorporované do buněčné DNA je kvantifikováno pomocí scintilačního počítáče.

Lidská heparinizovaná periferní krev byla získána od zdravých dobrovolníků punkcí z kubitální žíly. Krev byla naředěna v PBS (1:3) a mononukleární buňky byly odseparovány centrifugací ve Ficoll-Hypaque hustotním gradientu (Pharmacia, 1.077 g/ml) při 2200 g po dobu 30 minut. Při následující centrifugaci byly lymfocyty promývány v PBS, poté resuspendovány v buněčném kultivačním mediu (RPMI 1640, 2mM glutamin, 100 U/ml penicilin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 10 % fetální telecí sérum a hydrogenuhličitán sodný).

Buňky byly naředěny na cílovou hustotu 1.100.000 buněk/ml a byly pipetovány (180 μl) do 96-ti jamkových mikrotitračních destiček. Testované látky byly přidány k buněčným suspenzím ve čtyřkovém ředění v 20 μl alikvotech/jamku v čase nula. Obvykle byly testované sloučeniny vyhodnocovány v šesti koncentracích s nejvyšší testovanou koncentrací 266.7 μM . Jednotlivé koncentrace derivátů byly testovány v dubletu. Lymfocyty ve všech jamkách s výjimkou nestimulovaných kontrol byly aktivovány přidáním 50 μl konkanavalinu A (25 $\mu\text{g/ml}$). Buněčné suspenze byly dále inkubovány 72 hodin při 37 °C a při 100 % vlhkosti v atmosféře 5 % CO_2 . Na konci inkubace byly buňky analyzovány pomocí ^3H -TdR:

Buňky byly inkubovány s 0.5 μCi (20 μl zásobního roztoku 500 $\mu\text{Ci/ml}$) na jamku po dobu 6 hodin při 37 °C a 5 % CO_2 . V dalším kroku byl použit automatizovaný buněčný harvester pro lýzu buněk ve vodě a adsorpci DNA na filtr ze skleněných vláken o velikosti mikrotitračního panelu. DNA s inkorporovaným ^3H -TdR je zadržena na filtru, přičemž neinkorporovaný materiál filtrem prochází. Filtry byly usušeny při teplotě místnosti přes noc, uzavřeny v plastických sáčkách s 10-12 ml scintilační tekutiny. Množství ^3H -TdR přítomné na každém filtru bylo stanoveno scintilačním počítačem. Efektivní imunosupresivní dávka (ED) byla spočítána podle následujícího vzorce: $\text{ED} = (\text{CCPM}_{\text{jamka s test. derivátem}} / \text{průměrná CCPM}_{\text{kontrolní jamka}}) \times 100 \%$. Hodnota ED_{50} , což je koncentrace látky inhibující proliferaci 50 % lymfocytů, byla spočítána z dávkových křivek.

Pro vyhodnocení imunosupresivní aktivity nových sloučenin byla analyzována jejich schopnost inhibovat polyklonálním mitogenem stimulovanou proliferaci normálních lidských lymfocytů (Tab. 9). Uvedené výsledky ukazují, že tyto sloučeniny mají minimální vliv na inkorporaci ^3H -thymidinu v klidových (nestimulovaných) lymfocytech, nicméně účinně inhibují proliferaci mitogenem aktivovaných lymfocytů. Efektivní imunosupresivní dávka nových derivátů za *in vitro* podmínek byla v rozmezí 10–40 μM .

Tabulka 9
Imunosupresivní aktivity nových sloučenin

SUBSTITUENT V POLOZE N ⁶ ADENOSINU	Lidské lymphocyty ED ₅₀ (μM)
2-hydroxybenzylamino	4.8
3-hydroxybenzylamino	10.7
2-fluorobenzylamino	5.6
3-fluorobenzylamino	7.1
4-fluorobenzylamino	9.4
2-methylbenzylamino	5.8
3-methylbenzylamino	6.5
3,4-dihydroxybenzylamino	8.3
2-hydroxy-3-chlorobenzylamino	2.1
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	1.4
2-hydroxy-4-methoxybenzylamino	1.5
2-chlorobenzylamino	8.4
3-chlorobenzylamino	2.5
4-chlorobenzylamino	3.9

Příklad 12

Antisenescenční aktivity nových látek při testování v senescenčním biotestu na segmentech listů pšenice

Semena ozimé pšenice *Triticum aestivum* cv. Hereward byly promyty pod tekoucí vodou po 24 hod. a poté vysety do vermikulity nasyceného Knopovým živným roztokem.

Nádoby se semeny byly umístěny do klimatizované růstové komory s 16/8 hodinovou světelnou periodou (světelná intenzita $50 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a teplotou 15°C . Po 7 dnech měly semenáčky vyvinutý první praporcový list a druhý list začínal prorůstat. Z prvních listů vždy od 5 rostlin byly odebrány vrcholové sekce dlouhé přibližně 35 mm, které byly zkráceny tak aby jejich váha byla přesně 100 mg. Bazální konce těchto 5 listových segmentů byly umístěny do jamek mikrotitračních polystyrenových destiček obsahujících 150 ml roztoku testovaného derivátu. Destičky byly umístěny do plastického boxu vystlaného filtračním papírem, který byl nasycen vodou za účelem maximální vzdušné vlhkosti. Po 96 hodinách inkubace ve tmě při 25°C byly listové sekce vyjmuty a chlorofyl extrahován v 5 ml 80% ethanolu zahřátím při 80°C po dobu 10 min. Objem vzorku byl poté doplněn na 5 ml přidáním 80% ethanolu. Absorbance extraktů byla měřena při 665 nm. Jako kontroly byly měřeny rovněž chlorofylové extrakty z listů a listových vrcholů inkubované v deionizované vodě. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z 5 opakování a celý experiment byl zopakován minimálně 2-krát. Výsledky těchto experimentů byly vyneseny ve formě grafů závislosti obsahu chlorofylu v senescenčních listech v závislosti na koncentraci (viz Obr. 12). V každém experimentu byla použita jako kontrolní látky 6-benzylaminopurin ribosid, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokininy byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na 10^{-3} M. Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu 10^{-8} až 10^{-4} M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevýšila 0.2% a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu.

Ze získaných dat (obr. 12) byla vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této koncentraci (Tab. 10). 10^{-4} M koncentrace BAPR byla postulována jako 100% biologické aktivity.

Tabulka 10

Účinek nových cytokinů na retenci chlorofylu v extirpovaných listových segmentech pšenice. Hodnoty v tabulce jsou vyjádřeny v % výchozího obsahu chlorofylu v čerstvých listech před inkubací.

Substituent N6	Maximální účinná koncentrace (mol.l^{-1})	účinnost (%) [10^{-4}mol.l^{-1} BAP = 100%]
----------------	---	---

2-fluorobenzylamino	10^{-4}	118±19
3-fluorobenzylamino	10^{-4}	220±16
4-fluorobenzylamino	10^{-4}	148±2
2-chlorobenzylamino	10^{-4}	119±9
3-chlorobenzylamino	10^{-4}	72±8
4-chlorobenzylamino	10^{-4}	104±6
2-bromobenzylamino	10^{-5}	86±19
3-bromobenzylamino	10^{-4}	89±10
4-bromobenzylamino	10^{-4}	76±11
3-jodobenzylamino	10^{-4}	98±4
2-methylbenzylamino	10^{-4}	142±6
3-methylbenzylamino	10^{-4}	143±9
4-methylbenzylamino	10^{-4}	55±5
2-methoxylbenzylamino	10^{-4}	198±12
3-methoxylbenzylamino	10^{-4}	209±8
4-methoxylbenzylamino	10^{-4}	110±9
2,4-dichlorobenzylamino	10^{-5}	5±1
3,4-dichlorobenzylamino	10^{-4}	151±29
2,3-dimethoxylbenzylamino	10^{-4}	106±17
3,4-dimethoxylbenzylamino	10^{-4}	47±6
3-chloro-4-fluorobenzylamino	10^{-4}	156±10
3,5-difluorobenzylamino	10^{-4}	195±14
2,4-difluorobenzylamino	10^{-4}	171±8
2,3,4-trifluorobenzylamino	10^{-4}	144±12
2,3,6-trifluorobenzylamino	10^{-4}	133±14
2-hydroxy-3-methoxylbenzylamino	10^{-4}	30±8
3-hydroxy-4-methoxylbenzylamino	10^{-4}	22±5

Vyvinuté látky mají velmi silné antisenescenční účinky. Některé z nich vyvolávají až 200% nárůst obsahu chlorofylu v extirpovaných listech pšenice oproti kontrole.

Příklad 13

Stimulační vliv nových látek na buněčné dělení rostlinných buněk

Stimulační vliv nově připravených derivátů byl testován v kalusovém biotestu za použití cytokinin-dependentního kalusu tabáku. Tento cytokinin-dependentní tabákový kalus *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 byl udržován při 25 °C na modifikovaném mediu Murashige-Skoog obsahujícím na 1 litr: 4 μmol kys. nikotinové, 2.4 μmol pyridoxin hydrochloridu, 1.2 μmol thiaminu, 26.6 μmol glycinu, 1.37 μmol glutaminu, 1.8 μmol myo-inositolu, 30 g sacharosu, 8 g agaru, 5.37 μmol α-naftylacetové kyseliny a 0.5 μmol 6-benzylaminopurinu. Subkultivace probíhala každé 3 týdny. Čtrnáct dní před započítáním biotestu byl kalus přenesen na médium bez 6-benzylaminopurin ribosidu. Stimulační růstová aktivita byla stanovena na základě nárůstu čerstvé hmoty kalusu po 4 týdnech kultivace. Pět replikátů bylo připraveno pro každou testovanou koncentraci a daný test byl opakován minimálně 2-krát. V každém experimentu byla použita jako kontrolní látka 6-benzylaminopurin ribosidu, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokininy byly rozpouštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na 10^{-3} M. Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu 10^{-8} až 10^{-4} M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevýšila 0.2% a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu. Stimulační aktivita byla vypočtena z růstových křivek závislosti čerstvé hmoty kalusu na koncentraci, jejichž příklady jsou znázorněny na obr. 6.

Ze získaných dat (obr. 13) byla opět vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této koncentraci (Tab. 11). 10^{-6} M koncentrace BAP byla postulována jako 100% biologické aktivity.

Tabulka 11

Vliv nových cytokininů na růst cytokinin-dependentního tabákového kalusu *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38

Substituent N6	maximální účinná koncentrace (mol.l ⁻¹)	účinnost (%) [10^{-5} mol.l ⁻¹ BAP = 100%]
2-fluorobenzylamino	10^{-6}	100±9

3-fluorobenzylamino	10^{-5}	91±6
4-fluorobenzylamino	10^{-6}	100±6
2-chlorobenzylamino	10^{-6}	93±4
3-chlorobenzylamino	10^{-5}	96±5
4-chlorobenzylamino	10^{-6}	46±14
2-bromobenzylamino	10^{-5}	100±4
3-bromobenzylamino	10^{-6}	82±11
4-bromobenzylamino	10^{-6}	15±11
3-jodobenzylamino	10^{-6}	47±12
2-methylbenzylamino	10^{-6}	98±4
3-methylbenzylamino	10^{-6}	90±2
4-methylbenzylamino	10^{-6}	95±6
2-methoxylbenzylamino	10^{-5}	108±1
3-methoxylbenzylamino	10^{-6}	92±1
4-methoxylbenzylamino	10^{-6}	2±2
2,3-dimethoxylbenzylamino	10^{-6}	5±2
3-chloro-4-fluorobenzylamino	10^{-6}	87±4
2-chloro-4-fluorobenzylamino	10^{-5}	98±4
3,5-difluorobenzylamino	10^{-6}	95±3
2,3,6-trifluorobenzylamino	10^{-5}	92±2
2,4,5-trifluorobenzylamino	10^{-5}	95±3

Příklad 14

Testování nových cytokininů v amarantovém biotestu

Pro studium cytokininové aktivity byl rovněž použit "amarantový" biotest (Biddington a Thomas, Planta 11:183-186, 1973) v následující modifikaci. Semena *Amaranthus caudatus* var. *Atropurpurea* byla povrchově sterilizována 10% N-chlorobenzensulfoamidem (w/v) po dobu 10 min a poté promyta 5-krát deionizovanou vodou. Semena byla rozmístěna v 15 cm Pertriho miskách s filtračním papírem saturovaným destilovanou vodou. Po 72 hodinách kultivace při 25 °C ve tmě byly ze semenáčků odstraněny kořeny. Tyto explantáty obsahující 2

kotyledony a hypokotyl byly umístěny do 5 cm Petriho misek on 2 vrstvy filtračního papíru nasyceného 1 ml inkubačního média obsahujícího 10 μmol $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, pH 6,8, 5 μmol tyrosinu a testovaný cytokinin. Na misku bylo umístěno 20 explantátů. Veškeré manipulace byly prováděny pod zeleným světlem v temné komoře. Po 48 hodinách inkubace při 25 °C ve tmě byl betacyanin extrahován cestou zmrazení explantátů v 3.33 μM kyselině octové. Koncentrace betacyaninu byla stanovena porovnáním absorbancí při 537 a 620 nm a vypočtena pomocí vzorce $\Delta A = A_{537\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$. Hodnoty byly vyneseny do grafů závislosti ΔA na koncentraci (Obr.7). Pět replikátů bylo připraveno pro každou testovanou koncentraci a daný test byl opakován minimálně 2-krát. V každém experimentu byla použita jako kontrolní látky 6-benzylaminopurin, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokininy byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na 10^{-3} M. Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu 10^{-8} až 10^{-1} M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevýšila 0.2% a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu.

Ze získaných dat (obr. 14) byla vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této koncentraci (Tab. 12). 10^{-1} M koncentrace BAP byla postulována jako 100% biologické aktivity.

Tabulka 12

Vliv nových cytokininů na obsah betacyaninu v explantátech kotyledonů/hypokotylů
Amaranthus caudatus.

	Substituent N6	Maximální účinná koncentrace (mol.l^{-1})	účinnost (%) [10^{-5}mol.l^{-1} BAP = 100%]
1.	2-fluorbenzylamino	10^{-4}	96 \pm 2
2.	3-fluorbenzylamino	10^{-4}	92 \pm 6
3.	4-fluorbenzylamino	10^{-5}	71 \pm 4
4.	2-chlorbenzylamino	10^{-5}	113 \pm 7
5.	3-chlorbenzylamino	10^{-5}	139 \pm 12
6.	4-chlorbenzylamino	10^{-5}	35 \pm 9

7.	2-brombenzylamino	10^{-4}	147 ± 7
8.	3-brombenzylamino	10^{-4}	151 ± 16
9.	4-brombenzylamino	10^{-5}	30 ± 8
10.	3-jodbenzylamino	10^{-5}	102 ± 18
11.	2-methylbenzylamino	10^{-5}	105 ± 14
12.	3-methylbenzylamino	10^{-5}	103 ± 16
13.	4-methylbenzylamino	10^{-5}	32 ± 7
14.	2-methoxybenzylamino	10^{-5}	86 ± 4
15.	3-methoxybenzylamino	10^{-4}	98 ± 10
16.	4-methoxybenzylamino	10^{-4}	17 ± 8
17.	3-nitrobenzylamino	10^{-4}	66 ± 7
18.	4-nitrobenzylamino	10^{-4}	25 ± 3
19.	2,4-dichlorbenzylamino	10^{-4}	3 ± 2
20.	3,4-dichlorbenzylamino	10^{-4}	68 ± 10
21.	2,3-dimethoxybenzylamino	10^{-4}	21 ± 7
22.	2,4-dimethoxybenzylamino	10^{-5}	3 ± 3
23.	3,4-dimethoxybenzylamino	10^{-4}	2 ± 1
24.	3,4-dihydroxybenzylamino	10^{-4}	8 ± 3
25.	2,4-difluorbenzylamino	10^{-4}	88 ± 7
26.	3,5-difluorbenzylamino	10^{-4}	88 ± 1
27.	2,3,6-trifluorbenzylamino	10^{-4}	94 ± 1
28.	3-chloro-4-fluorbenzylamino	10^{-4}	82 ± 5
29.	2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	10^{-4}	18 ± 5
30.	3-hydroxy-4-methoxybenzylamino	10^{-4}	0
31.	2-chloro-4-fluorbenzylamino	10^{-4}	115 ± 1
32.	2,4,5-trifluorbenzylamino	10^{-4}	120 ± 1

Příklad 15

Účinky testovaných látek na *in vitro* a *post vitro* množení a zakořeňování růže (*Rosa multiflora*).

Úlohou tohoto experimentu bylo otestovat zda nové látky jsou prakticky využitelné v tkáňových kulturách. Byl studován index množení a *post vitro* účinky. Růže (*Rosa hybrida*) byly pěstovány v 350 ml nádobách se šroubovacím polykarbonátovým uzávěrem. Každá nádoba obsahovala 100ml autoklávovaného kultivačního media (120 °C, 20 min.). Rostliny byly kultivovány při teplotě 23 ± 2 °C a světelné periodě 16 hodin při $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR. Základní medium (MBR) obsahovalo makro-, mikro-prvky a vitamíny podle Murashigeho a Skooga (1962), 95 μM NaFeEDTA, 555 μM myo-inositolu, 111 mM sacharosy, 1.332 mM glycinu, 684 μM L-glutaminu and 7g/l agaru. Toto medium bylo doplňováno 10 μM testované látky. 6-Benzylaminopurin (BAP) byl používán jako standard, kontrolní medium neobsahovalo žádný cytokinin. Po uplynutí 8 týdnů byl stanoven přírůstek nových prýtů na jeden explantát, stejně jako počet kořenů na jeden explantát a celková délka kořenů na jeden explantát. Po odstranění kořenů byly explantáty (skupiny prýtů) přeneseny do rašeliny. Po čtyřech týdnech aklimatizace byl znovu stanoven počet kořenů a jejich celková délka na jeden explantát.

Podle předpokladu, rostliny pěstované na mediu neobsahujícím cytokininy neměly téměř žádné nové prýty. Původní explantáty vyrostly v kvalitní jednotlivé výhony, velmi dobře zakořeňující (Tab.13). Explantáty rostoucí na BAP se vyznačovaly vysokým indexem množení (velkým množstvím nových prýtů) a velmi špatným zakořeňováním (Tab. 13). Všechny testované nové látky, deriváty BAP, indukovaly tvorbu nových výhonů a zakořeňovaly výrazně lépe než BAP (Tab.13).

Tabulka 13

Účinek testovaných látek, cytokininů, na *in vitro* a *post vitro* množení a zakořeňování růže (*Rosa multiflora*).

Substituent	In vitro				Ex vitro	
	Počet nových prýtů na jeden explantát	Počet květů na jeden explantát	Počet kořenů na jeden explantát	Celková délka kořene na jeden explantát (cm)	Počet kořenů na jeden explantát	Celková délka kořene na jeden explantát (cm)
Kontrola	0.2	0.03	0.8	1.2	4.6	17.1
BAP*	3.8	0.00	0.0	0.0	0.6	1.1
2-methoxybenzylamino	1.4	0.17	0.0	0.0	1.6	4.8
3-methoxybenzylamino	5.6	0.00	0.0	0.0	1.4	3.5

* BAP = 6-benzylaminopurin

Příklad 16

Inhibice senescence *in vitro* pěstovaných explantátů *Rosa hybrida*.

Problémem tkáňových kultur růží jsou časté příznaky senescence explantátů. Listy začínají hnědnout a po několika týdnech všechny explantáty v nádobě hynou. Symptomy nastupují dříve, jestliže je nádoba vzduchotěsně uzavřena, například plastikovou folií. To ukazuje na důležitou úlohu ethylenu v tomto procesu. Cytokininové aplikované do kultivačního media indukují tvorbu ethylenu, je proto užitečné testovat nové látky cytokininové povahy také v tomto systému.

Růže *Rosa hybrida* 'Pailin' byla pěstována v 350 ml nádob se šroubovacím polykarbonátovým uzávěrem. Každá nádoba obsahovala 100ml autoklávovaného kultivačního media (120°C, 20 min.). Rostliny byly kultivovány při teplotě 23 ± 2 °C a světelné periodě 16 hodin při $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR. Základní medium (MBR) obsahovalo makro-, mikro-prvky a vitamíny podle Murashigeho a Skooga (1962), 36.7 mg/l NaFeEDTA, 50 mg/l NaFeEDDHA, 100 mg/l μM myo-inositolu, 30 g/l sacharosy, 100 mg/l glycinu, 50 mg/l calcium pantothenatu, 100 mg/l L-glutaminu a 7 g/l agaru. Toto medium bylo doplňováno 10 μM testované látky. 6-benzylaminopurin (BAP) byl používán jako standard, kontrolní medium neobsahovalo žádný cytokinin. Příznaky stárnutí explantátů byly studovány po šesti týdnech kultivace (obr.17). Bylo zaznamenáváno objevení prvního hnědého listu a den úhynu celého explantátu.

Výsledky jsou ukázány na obr. 15 a 16. Relativní počet uhynulých explantátů na mediu s BAP odpovídá sigmoidní křivce, což naznačuje že jeho vliv na senescenci je zesílen autokatalýzou, pravděpodobně ethylenem. Při použití medií s 6-(3-hydroxybenzylamino)purinem (mT) a 6-(3-methoxybenzylamino)purin ribosidem (3MeOBAPR) byla situace výrazně lepší (obr. 8). Nejlepší testovanou látkou byl bezesporu 3MeOBAPR; ještě 121 den kultivace byly živé téměř všechny explantáty. I když ani na mediu s 3MeOBAPR nebylo možné zabránit zhnědnutí některých listů, tyto rostliny mohou být přesto bez problémů použity pro další subkultivaci. Užití 3MeOBAPR je statisticky významným vylepšením při mikropropagaci *Rosa hybrida*.

Příklad 17

Polní pokusy – ošetření porostů pšenice jarní testovanými látkami

Porosty (v posledních 4 letech) pšenice jarní jsou vysévány v řepářském výrobním typu na pokusném pozemku České zemědělské univerzity (ČZU) výsevkem 400 klíčivých zrn na

1m² do naorané a uválené zeminy obsahující podle agrochemických rozborů provedených na Katedře pedologie ČZU 116,1 mg/kg P, 228,3 mg/kg K, a 211,8 mg/kg Mg. Odstup orby a setí zpravidla 3-4 dny, jen za nepříznivého počasí větší. Předplodinou je řepka. Příprava půdy se dělá klasicky smykem a branami po zasetí se válí. Charakter ročníků, průměrné měsíční teploty a srážky jsou v tabulce 14.

Tabulka 14

Charakteristika ročníků-teplotní průměr a srážkový úhrn v zájmové oblasti

Ročník	1997		1998		1999		2000		2001	
	teploty	srážky	teploty	srážky	teploty	Srážky	teploty	Srážky	teploty	srážky
Leden	-3,2	20,3	2,2	8,37	0,64	8,7	-1,5	22	1,8	22,3
Únor	3,3	18,7	5	12,8	3,47	18,9	3,1	22	-2,3	31,9
Březen	6,8	23,7	5,4	18,4	3,24	30,6	3,9	26	3,2	11,9
Duben	9,7	29,3	4,6	15	9,88	11,7	10,5	41	10,6	16,5
Květen	8,7	15,2	11,4	5,2	13,6	25,4	15,4	54	16,3	66,1
Červen	12,3	70,5	15,4	37	16,7	101,2	17,5	63	16,6	97,7
Červenec	17,1	108,9	18,5	79,8	17,4	67,4	15,8	69	17,1	102,3
Srpen	18,7	60,5	19,7	58,4	17,8	22,5	18,8	64	17,6	56,7
Září	13	41,5	13,8	67,1	15,2	68,8	13,7	42	11,5	68
Říjen	6,5	34,1	9,6	37,4	8,54	86,4	10,6	35	8,3	48,6
Listopad	2,7	28,2	5,7	41,2	0,54	23,4	2,5	29	1	50,2
Prosince	1,2	46,1	2,4	27,8	-0,55	8,1	0,4	26	3,6	33,9
Průměr	8,07		9,5		8,9		9,2		8,8	
úhrn		497		408,47		473,1		471		606,1

Charakteristika počasí ve vegetační sezoně										
Ročník	1997		1998		1999		2000		2001	
	teploty	srážky	teploty	srážky	teploty	Srážky	teploty	Srážky	teploty	srážky
Duben	9,7	29,3	4,6	15	9,88	11,7	10,5	41	10,6	16,5
Květen	8,7	15,2	11,4	5,2	13,6	25,4	15,4	54	16,3	66,1
Červen	12,3	70,5	15,4	37	16,7	101,2	17,5	63	16,6	97,7
Červenec	17,1	108,9	18,5	79,8	17,4	67,4	15,8	69	17,1	102,3
průměr	12		12,5		14,4		14,8		8,8	
úhrn		223,9		137		205,7		227		282,6

Od vzejití v 14 denních intervalech jsou sledovány délky rostlin, listová plocha, sušina, vývin vegetačního vrcholu - základu budoucího klasu, a počet odnoží, po ošetření i obsah chlorofylu v listech. Z těchto primárních údajů se počítají hodnoty, obvyklé v produkční fyziologii například pokryvnost listová LAI, fotosyntetický potenciál LAD, odnožovací potenciál OP. Pokusy s ošetřením porostů pšenice jarní Sandry na poli v maloparcelkách (velikost 10 m² n=4 opakování) se dělají postřikem látek (cytokininů) dávkou 1 litr roztoku o koncentraci 1 mol.10⁻⁶ v přechodu fází sloupkování-metání (49 DC). Navážka dodaného přípravku z laboratoře se

rozpouští v horké destilované vodě v objemu 1 litr. Poté se objem doplní na dvojnásobek a aplikuje na $4 \times 10 \text{ m}^2$, protože aplikace objemu 1 litru roztoku na ploše 40 m^2 je technicky v polních podmínkách na již poměrně vzrostlý, vyspělý porost, neproveditelná.

Po aplikaci se během 6 dní od ošetření stanovuje aktivita enzymu glutamátkinasy. Tento enzym byl vybrán protože z jeho změn lze soudit na optimalizaci pohybu látek (živin z kořenů, asimilátů od zdrojů vzniku do sinku, obecně do zásobních orgánů, v případě obilnin do obílek), na respiraci, přenosy energie-adenosintrifosfátu, ukládání látek, a procesy růstu a vývinu, i na metabolismus prolinu, o němž je z literatury známo, že hraje významnou roli v adaptačních reakcích vůči stresu (nevhodné stanoviště, sucho, zasolení, chlad aj.), i v regulaci potenciální a reálné produktivity (omezení redukce počtu založených zrn v klasu). Enzym glutamátkinasa, katalyzuje přeměnu glutamátu na γ glutamylfosfát, což je první chemická reakce při syntéze prolinu z glutamátu. Tak je enzym glutamátkinasa jako nezbytný prekursor dalších metabolických pochodů v rostlině i ukazatelem inhibice stresu. Stanovuje se spektrofotometricky obměnou hydroxamátové metody dle Vašákové (1980). K analýze se připravují standartní metodou acetonové prášky, které se vyextrahují 0.05 mol/l draselno-fosfátovým pufrům pH=7,2 a odstředí. Tak se získají supernatanty z nichž se krystalickým síranem amonným vysolí frakce glutamátkinázy, načež se amonné ionty odstraní dialýzou a aktivita glutamátkinázy stanoví spektrofotometricky. Zvýšená akumulace prolinu stresem odpovídá „zpětnou vazbou“ inhibičnímu působení na enzym glutamátkinázu.

Posklizňový rozbor, hodnotící délky klasu a počet zrn v klasu se dělal na 30 rostlinách od varianty ošetření, výnos z plochy 1 m^2 a HTS se stanovil v 8 opakováních, z nichž se dělal přepočet na hektarový výnos.

Tabulka 15

Posklizňový rozbor a aktivita glutamátkinázy (GK) po ošetření vybranými cytokininy (BAP – 6-benzylaminopurin, BAPR – 6-benzylaminopurin ribosid, 3ClBAPR – 6-(3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 3BrBAPR – 6-(3-bromobenzylamino)purin ribosid, 3,4ClBAPR – 6-(3,4-dichlorobenzylamino)purin ribosid)

	HTS (%)	Σ klasů/ m^2 (%)	Výnos (%)	Σ zrn/klas (%)	GK%
Kontrola	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
BAP	102,0	101,1	115,4	111,9	108.2

BAPR	103,8	102,7	121,9	114,3	154,1
3ClBAPR	108,3	100,5	128,8	119,1	124,7
3Br BAPR	101,5	104,9	131,8	123,8	116,6
3,4 Cl BAPR	101,5	99,7	113,3	111,9	114,2

Příklad 18

Suché tobolky

5000 tobolek, každá obsahující jako aktivní složku 0.25 g jedné ze sloučenin o vzorci I, II a III zmíněných v předcházejících nebo následujících příkladech, se připraví následujícím postupem:

Složení

Aktivní složka	1250 g
Talek	180 g
Pšeničný škrob	120 g
Magnesium stearát	80 g
Laktosa	20 g

Postup přípravy: Rozetřené látky jsou protlačeny přes síto s velikostí ok 0.6 mm. Dávka 0.33 g směsi je přenesena do želatinové tobolky pomocí přístroje na plnění tobolek.

Příklad 19

Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0.05 g jedné z látek o vzorci I, II a III zmíněných v předcházejících nebo následujících Příkladech, se připraví následujícím postupem:

Složení

Aktivní složka	250 g
Lauroglykol	2 litry

Postup přípravy: Prášková aktivní látka je suspendována v Lauroglykolu[®] (propylenglykol laurát, Gattefoscé S. A., Saint Priest, Francie) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0.419 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

Příklad 20

Měkké tobolky

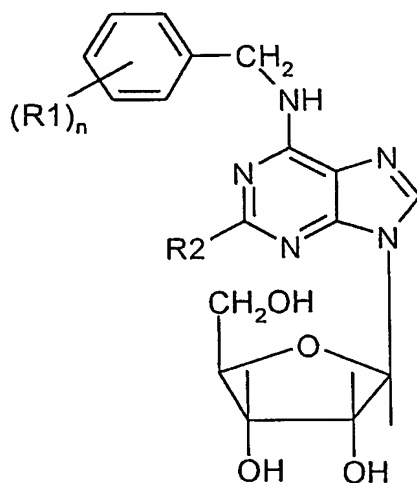
5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0.05 g jedné ze sloučenin o vzorci I, II a III zmíněných v předcházejících nebo následujících Příkladech, se připraví následujícím postupem:

Složení

Aktivní složka	250g
PEG 400	1 litr
Tween 80	1 litr

Postup přípravy: Prášková aktivní složka je suspendována v PEG 400 (polyethylen glykol o Mr mezi 380 a 420, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a Tween® 80 (polyoxyethylen sorbitan monolaurát, Atlas Chem. Ind., Inc., USA, dodává Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na částice o velikosti 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0.43 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu obecného vzorce I

I

a jejich farmaceuticky využitelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, ve kterém

R2 znamená atom vodíku, hydroxyl, halogen, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, methylmerkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl nebo karbamoyl skupinu, a (R1)_n, ve které

n znamená druhý až šestý uhlíkový atom fenylu substituovaný jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující R1 kde

R1 znamená atom vodíku, hydroxyl, halogen, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, methylmerkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl nebo karbamoyl alkyl, substituovaný alkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloalkylalkyl, arylalkyl, heteroalkyl, heteroarylalkyl, cykloheteroalkyl alkyl nebo R1'-X, ve které

X znamená NH-, -N(C₁-C₆-alkyl)-, skupinu -O- nebo skupinu -S- a

R1' znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, acyl, amido, sulfo, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, aryl, substituovaný aryl, heterocyklus, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, arylalkyl, cykloheteroalkyl, substituovaný

cykloheteroalkyl, heteroarylalkyl, heteroalkyl, cykloalkyl alkyl a cykloheteroalkyl alkyl.

příčemž uvedené dosud nevymezené generické skupiny mají významy uvedené v následující legendě, příčemž

halogen znamená

atom halogenu vybraný ze skupiny zahrnující atom fluoru, atom bromu, atom chloru a atom jodu,

alkyl znamená

- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

substituovaný alkyl znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinou, příčemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

karbyloxyl znamená

.skupinu $-OR_a$, ve které R_a znamená alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl nebo substituovaný cykloheteroalkyl, příčemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

karbylmerkpto znamená

.skupinu $-SR_b$, ve které R_b znamená alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl nebo substituovaný cykloheteroalkyl, příčemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

sulfo znamená $-SO_3R_c$, ve které R_c znamená

atom vodíku H,

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
 .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty zvoleným ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

sulfoamido znamená $\text{—NHSO}_3\text{R}_d$, kde R_d znamená

atom vodíku H,

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
 .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

acyl znamená

.skupinu —C(O)R_e , ve které R_e znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

aryloxy znamená

.skupinu —OAr , ve které Ar znamená aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

alkylamino znamená

.skupinu $\text{NR}_f\text{R}'_g$, ve které R_f a R'_g nezávisle jeden na druhém znamenají atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

amido znamená

.skupinu $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_h\text{R}'_i$, ve které R_h a R'_i nezávisle jeden na druhém znamenají atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

karboxyl znamená

.skupinu $-\text{C}(\text{O})\text{OR}_j$, ve které R_j znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

karbamino znamená

.skupinu $-\text{NHCOR}_k$, ve které R_k znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

aryl znamená

.aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem jako fenyl nebo bifenyl) nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický jako 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl,

substituovaný aryl znamená

aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem například fenyl nebo bifenyl nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický jako 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy,

alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

heterocyklus znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku,

heteroaryl znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický,

substituovaný heteroaryl znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

arylalkyl znamená

.skupinu -R₁-Ar, kde Ar znamená arylovou skupinu a R₁ znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

.aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem například fenyl nebo bifenyl nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický například 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

heteroalkyl znamená

.skupinu $-R_m-L$, ve které R_m znamená

- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a L znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku a případně substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

heteroarylalkyl znamená

.skupinu $-R_n-G$, ve které R_n znamená

- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a G znamená

heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, přičemž alespoň jeden heterocyklický kruh této skupiny je aromatickým kruhem, která může být případně substituována jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

cycloalkyl znamená

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů,

substituovaný cycloalkyl znamená

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

heterocycloalkyl znamená

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku nebo atom fosforu,

substituovaný cykloheteroalkyl znamená

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku nebo atom fosforu, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

cykloalkylalkyl znamená

.skupinu $-R_o-J$, ve které R_o znamená

- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a J znamená

- .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, nebo
- .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě, a

a heterocykloalkylalkyl znamená

.skupinu $-R_p-V$, ve které R_p znamená

- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické

substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a V znamená

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku a atom fosforu,

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku a atom fosforu, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkpto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkpto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami.

2. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce 1 vybrané ze skupiny zahrnující

6-(2-fluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-fluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-fluorobenzylamino)purin	ribosid,
6-(2-bromobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-bromobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-bromobenzylamino)purin	ribosid,
6-(4-bromobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-bromobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-iodobenzylamino)purin	ribosid,
6-(3-iodobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-iodobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-iodobenzylamino)purin	ribosid,
6-(2-chlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-chlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-chlorobenzylamino)purin	ribosid,
6-(3-chlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-chlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-chlorobenzylamino)purin	ribosid,
6-(2-acetylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-acetylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-acetylbenzylamino)purin	ribosid,
6-(4-acetylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-acetylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-karboxybenzylamino)purin	ribosid,
6-(4-karboxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-karboxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-acetoxybenzylamino)purin	ribosid,
6-(3-acetoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-acetoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-acetoxybenzylamino)purin	ribosid,
6-(2-nitrobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-nitrobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-nitrobenzylamino)purin	ribosid,
6-(4-nitrobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-nitrobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-sulfobenzylamino)purin	ribosid,
6-(3-sulfobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-sulfobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-sulfobenzylamino)purin	ribosid,

sulfobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-kyanobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-
 kyanobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-kyanobenzylamino)purin ribosid, 6-(5-nitro-2-
 methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-
 methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 methylaminobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-
 methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-
 hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hexylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 hexyloxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-formylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-
 formylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-formylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-
 ethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-ethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 ethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-ethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 penthylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-pentyloxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 fenoxibenzyllamino)purin ribosid, 6-(4-fenylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 propylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-propyloxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 oktylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-oktyloxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-
 ethyloxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-diacetoxibenzyllamino)purin ribosid, 6-(3,5-
 diacetoxibenzyllamino)purin ribosid, 6-(2,5-diaminobenzyllamino)purin ribosid, 6-(3,5-
 dibromobenzyllamino)purin ribosid, 6-(3,5-dibromo-4-methoxybenzyllamino)purin ribosid, 6-
 (2,3-dichlorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(2,4-dichlorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(2,5-
 dichlorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(2,6-dichlorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(3,4-
 dichlorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(3,5-dichlorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(2,3,4,5-
 tetrafluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-3,6-difluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(5-
 chloro-2-fluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(2,3,4-trifluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-
 (2,3,5-trifluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(2,4,5-trifluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-
 (3,4,5-trifluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(2,3,6-trifluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(3-
 chloro-2,6-difluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-6-fluorobenzyllamino)purin ribosid,
 6-(2,6-difluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(2,4-difluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(3,4-
 difluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(2,5-difluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(3,5-
 difluorobenzyllamino)purin ribosid, 6-(5-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzyllamino)purin ribosid,
 6-(4-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzyllamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-5-
 (trifluoromethyl)benzyllamino)purin ribosid, 6-(2-(difluoromethoxy)benzyllamino)purin ribosid,
 6-(3-(difluoromethoxy)benzyllamino)purin ribosid, 6-(4-(difluoromethoxy)benzyllamino)purin

ribosid, 6-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(2-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-6-fluoro-3-methylbenzylamino)purin
 purin ribosid, 6-(6-chloro-2-fluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(3-chloro-2-fluoro-6-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-difluoro-4-methylbenzylamino)purin
 ribosid, 6-(2,6-difluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-6-(trifluoromethyl)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(3-chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(3-fluoro-4-methyl benzylamino)purin ribosid, 6-(4-fluoro-3-methylbenzylamino)purin
 ribosid, 6-(5-fluoro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-3,6-difluorobenzylamino)purin
 ribosid, 6-(4-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloro-3-(trifluoromethyl) benzylamino)purin
 ribosid, 6-(4-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-bis(trifluoromethyl)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(3-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin
 ribosid, 6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-diethylaminobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin
 ribosid, 6-(3,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-ethylenedioxybenzylamino)purine
 ribosid, 6-(2,4-dihydroxybenzylamino)purin, 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxybenzylamino)purin
 ribosid, 6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dimethoxybenzylamino)purin
 ribosid, 6-(2,3-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dimethoxybenzylamino)purin
 ribosid, 6-(2,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin
 ribosid, 6-(2-hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-2-methoxybenzylamino)purin
 ribosid, 6-(3-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin
 ribosid, 6-(4-hydroxy-2-

methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-4,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-4,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-2,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-2,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-2,3-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-2,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-3,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dihydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dihydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dihydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxy-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dihydroxy-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,4-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,5-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4,5-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,4,5-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4,5,6-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,4-trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,4-trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4,5-trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid,

6-(2-hydroxy-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dihydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-dibromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-diiodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-methyl-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-methyl-4-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-diiodo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloro-3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-6-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(5-chloro-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloromethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-6-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloro-3-nitrobenzylamino)purin

ribosid, 6-(5-chloro-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-bromo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dibromo-4-hydroxybenzylamino)purin, 6-(3-bromo-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(4-bromomethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-butoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-t-butylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-t-butyl-2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-aminobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-aminobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-aminobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-diamino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-diamino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-amino-5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(5-amino-2-methylbenzylamino)purine ribosid, 6-(2-amino-3-nitrobenzylamino)purine ribosid, 6-(4-amino-3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-benzyloxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-acetylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-acetylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,4-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-bromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-bromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-bromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-iodobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-iodobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-iodobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chlorobenzylamino)purin

ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-karboxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-karboxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-acetoxibenzyllamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-acetoxibenzyllamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-acetoxibenzyllamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-nitrobenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-sulfobenzyllamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-sulfoobenzyllamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-sulfobenzyllamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-kyanobenzyllamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-kyanobenzyllamino)purin ribosid, 6-(4-kyanobenzyllamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-nitro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-methylaminobenzyllamino)purin ribosid, 6-(2-methoxybenzyllamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-methoxybenzyllamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-methoxybenzyllamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-hydroxybenzyllamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-hydroxybenzyllamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro,

bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-hexylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-hexyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-formylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-formylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-formylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-ethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-ethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-ethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-ethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-penthybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-penthyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fenoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fenylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-propylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-propyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-oktylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-oktyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-ethyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-diacetoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-diacetoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-diaminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dibromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dibromo-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino,

hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,4,5-tetrafluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-3,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-chloro-2-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,4-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,5-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,5-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4,5-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,6-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy,

chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-fluoro-3-methylbenzylamino)purin purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(6-chloro-2-fluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2-fluoro-6-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-difluoro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-difluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-6-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluoro-4-methyl benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-fluoro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-3,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl

nebo methylmercapto)-6-(2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-bis(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-diethylaminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-ethylenedioxybenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dihydroxybenzylamino)purin, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluoro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-methyl-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-methyl-4-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-diiodo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloro-3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-chloro-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloromethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl

nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloro-3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-chloro-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-bromo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dibromo-4-hydroxybenzylamino)purin, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-bromo-4-methoxybenzylamino)purin, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-bromomethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-butoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-butoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-/t-butyl/benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-t-butyl-2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-aminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-aminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-aminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-diamino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-diamino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl

nebo methylmercapto)-6-(4-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-amino-5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-amino-2-methylbenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-3-nitrobenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-amino-3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-benzyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,4-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid.

3. Způsob přípravy substitučního derivátu N⁶-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém R1 a R2 mají stejné významy jako v nároku 1, vyznačený tím, že se 6-chlor, brom, fluoro nebo methylthio derivát obecného vzorce I nukleofilně substituuje v poloze 6 za účelem převedení atomu chloru, fluoro nebo bromu v poloze 6 za některý jiný z významů obecného substituentu v poloze N⁶ za vzniku derivátu obecného vzorce I.

4. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro použití jako léčiva.

5. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro použití jako růstové regulátory rostlin, savců, mikroorganismů, kvasinek a hub.

6. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro použití jako kosmetické přípravky.

7. Farmaceutické, kosmetické a tkáňové přípravky obsahující sloučeninu obecného vzorce I či farmaceuticky přijatelnou sůl takového sloučeniny včetně farmaceutického nosiče.

8. Použití sloučenin obecného vzorce I při přípravě afinitních adsorpčních nosičů, imobilizovaných enzymů pro kontrolu výrobních procesů, reagentů pro imunodetekci, diagnostických vzorků, ¹⁴C, ³H, avidinem a biotinem značených sloučenin a oligonukleotidů.

9. Použití substitučního derivátu N⁶-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I nebo farmaceuticky přijatelných solí takového sloučeniny včetně farmaceutického nosiče pro přípravu farmaceutické kompozice použitelné jako mitotikum či antimitotikum, zejména při léčení nádorových onemocnění, při psoriáze, revmatické artritidy, lupusu, diabetu I typu, roztroušené skleróze, restenóze, polycystickému onemocnění ledvin, host graft disease a dny, parazitózách způsobených houbami anebo prvoky, Alzheimerově chorobě, anebo jako antineurogenerativního léčiva, anebo k supresi imunostimulace, anebo k léčení proliferčních onemocnění kůže.

10. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro použití jako růstového regulátoru v zemědělství, zejména pro zvýšení výnosu a kvality zemědělských produktů.

11. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro použití jako kosmetického přípravku pro zpomalení senescence savčích pokožkových buněk, jako keratinocytů či fibroblastů.

12. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro použití jako růstového regulátoru v tkáňových kulturách ke stimulaci proliferace a morfogeneze.

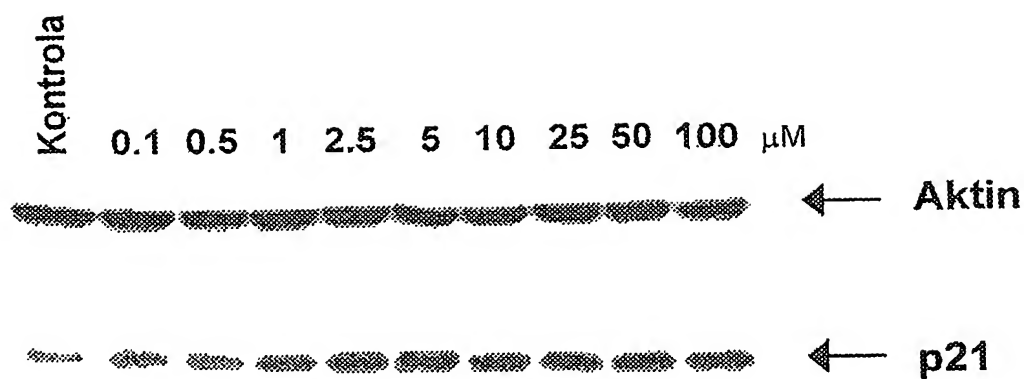
13. Použití substitučních derivátů N⁶-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu přípravků používaných ke klonování rostlinných i savčích zárodečných buněk a embryí, s výhodou oocytů.

14. Použití substitučních derivátů N⁶-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva na potlačení imunostimulace například arthritis nebo při supresi rejekce transplantovaných orgánů u savců.

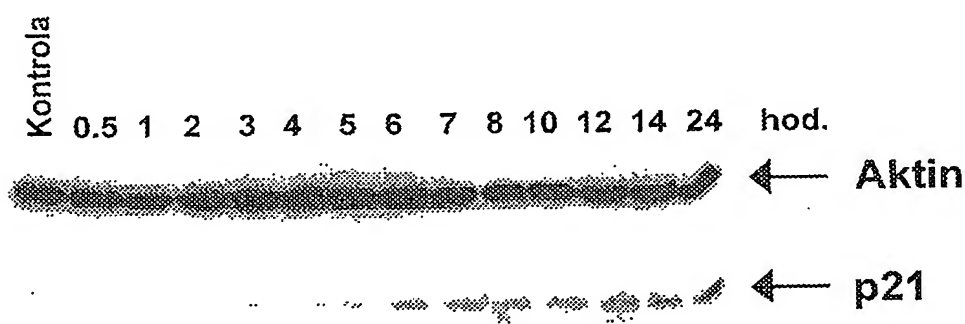
Anotace

Název: Substituční deriváty N⁶-benzyladenosinu, způsob jejich přípravy, jejich použití pro přípravu léčiv, kosmetických přípravků a růstových regulátorů, farmaceutické přípravky, kosmetické přípravky a růstové regulátory tyto sloučeniny obsahující

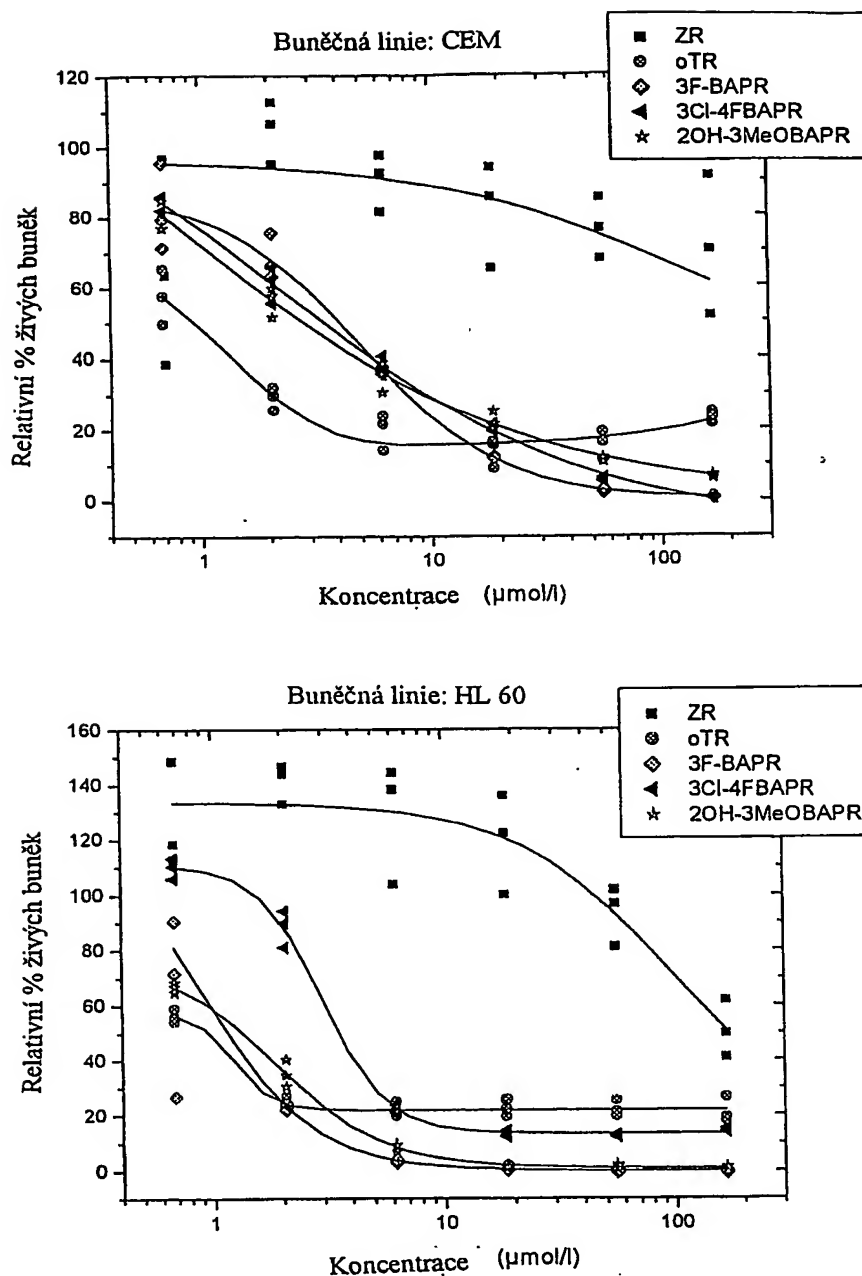
Řešení se týká nových substitučních derivátů N⁶-benzyladenosinu, které mají protinádorové, mitotické, imunosupresivní a antisenescenční účinky pro rostlinné, živočišné i lidské buňky a způsobu přípravy těchto derivátů. Zahrnuté jsou rovněž farmaceutické přípravky, kosmetické přípravky a růstové regulátory obsahující tyto deriváty jako účinnou látku a použití těchto derivátů pro výrobu léčiv, v biotechnologiích, v kosmetickém průmyslu a v zemědělství.



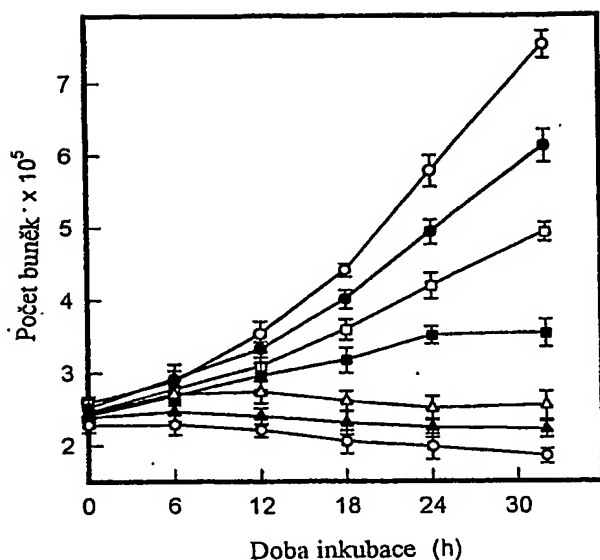
Obr. 1: Indukce proteinu p21^{WAF-1} v buňkách MCF-7 působením rozdílných koncentrací 2OH3MeOBAPR v řádu jednotek μmol na litr kultivačního média.



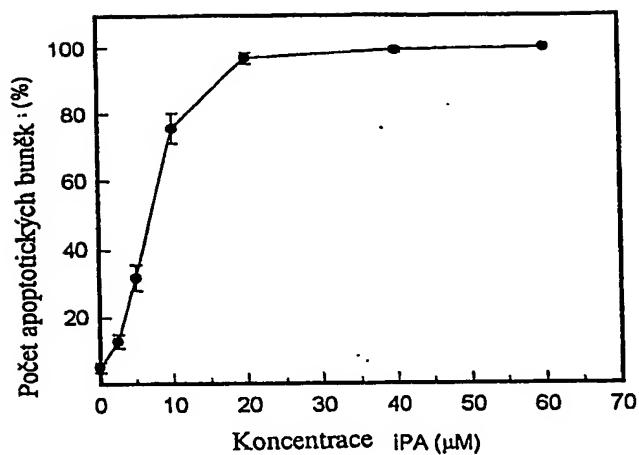
Obr. 2: Indukce p21^{WAF-1} v buňkách MCF-7 v rozmezí 6-24 hodin po přidavku 2OH3MeOBAPR v 1 μM koncentraci.



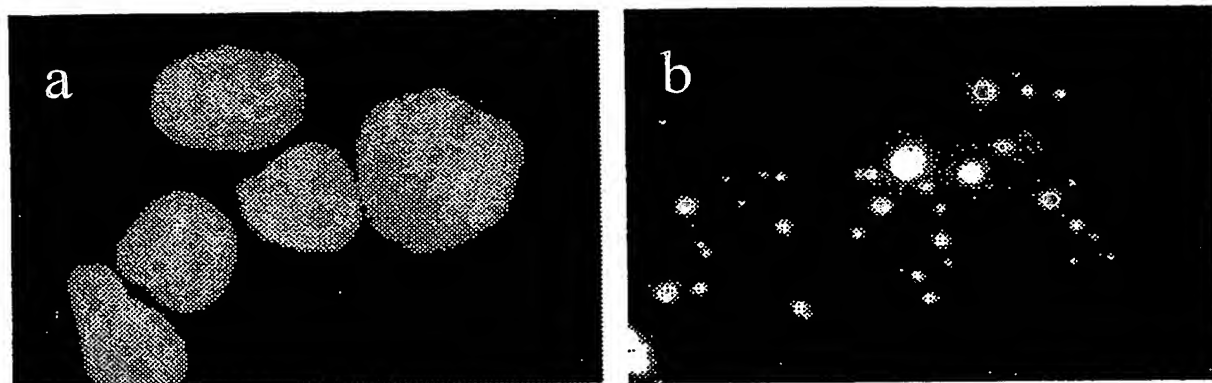
Obr. 3: Inhibice růstu nádorových buněčných linií CEM (A) a HL60 (B) novými cytokininy. Cytotoxicita byla stanovena pomocí testu Calcein AM. Aktivita je vyjádřena v procentech maximální aktivity (v nepřítomnosti inhibitoru). ZR: zeatin ribosid; oTR: *ortho*-topolin ribosid; 3F-BAPR: 6-(3-fluorobenzylamino)purin ribosid; 3Cl-4FBAPR: 6-(3-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid; 2OH3MeOBAPR: 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid.



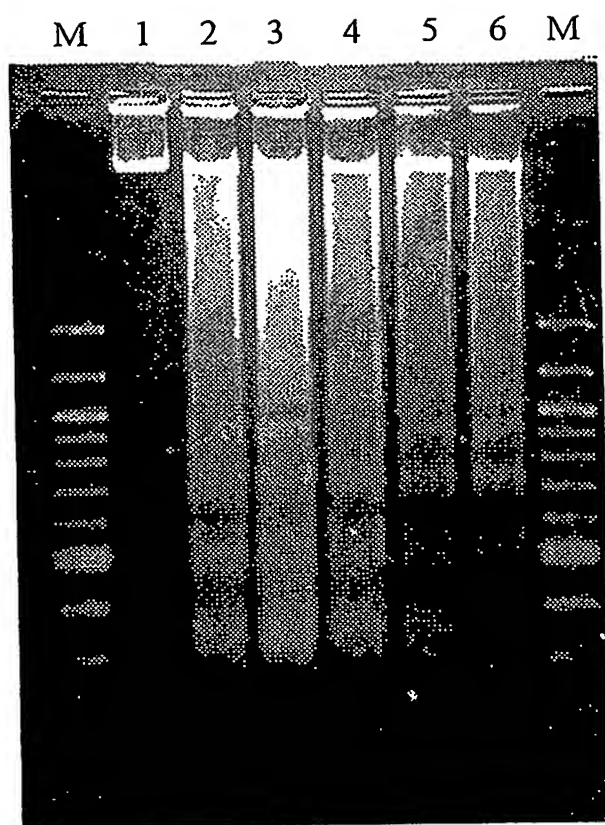
Obr. 4. Inhibice proliferace buněk HL-60 indukovaná 2OH3MeOBAPR. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 2OH3MeOBAPR v koncentraci 2.5 μM (plné kroužky), 5 μM (prázdné čtverce), 10 μM (plné čtverce), 20 μM (prázdné trojúhelníky), 40 μM (plné trojúhelníky) a 60 μM (prázdné šestiúhelníky). Buňky kultivované ve standardním médiu bez 2OH3MeOBAPR sloužily jako kontrola (prázdné kroužky).



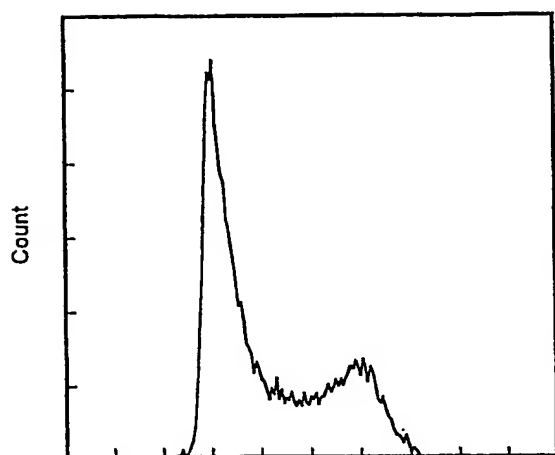
Obr. 5. Indukce apoptozy 2OH3MeOBAPR u buněk HL-60. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 2OH3MeOBAPR v uvedených koncentracích. Po 24 h inkubaci byl sledován výskyt apoptotických buněk vzhledem k morfologii jader. Buňky kultivované ve standardním médiu bez 2OH3MeOBAPR sloužily jako kontrola.



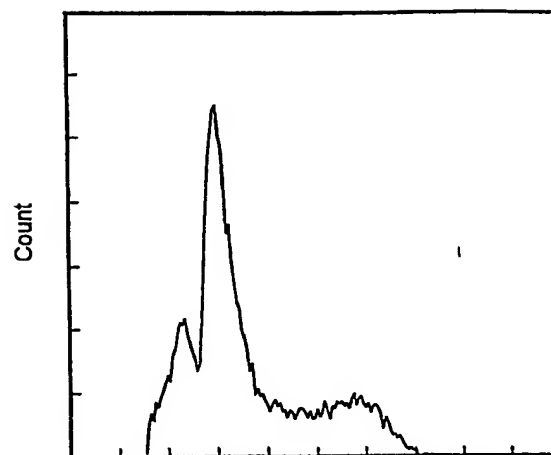
Obr. 6. Vliv 2OH3MeOBAPR na morfologii jader u buněk HL-60. Jádra buněk kultivovaných za standardních podmínek v médiu bez 2OH3MeOBAPR a), jádra buněk kultivovaných v médiu s přidavkem 5 μ M 2OH3MeOBAPR po dobu 24 hodin b).



Obr. 7. Vliv 2OH3MeOBAPR na integritu jaderné DNA u buněk HL-60. M - standardy molekulové hmotnosti. Pozice 1- DNA izolovaná z buněk kultivovaných v médiu bez iPA. Pozice 2-6 DNA izolovaná z buněk kultivovaných v médiu s přidavkem 5, 10, 20 40 a 60 μM 2OH3MeOBAPR po dobu 24 h.

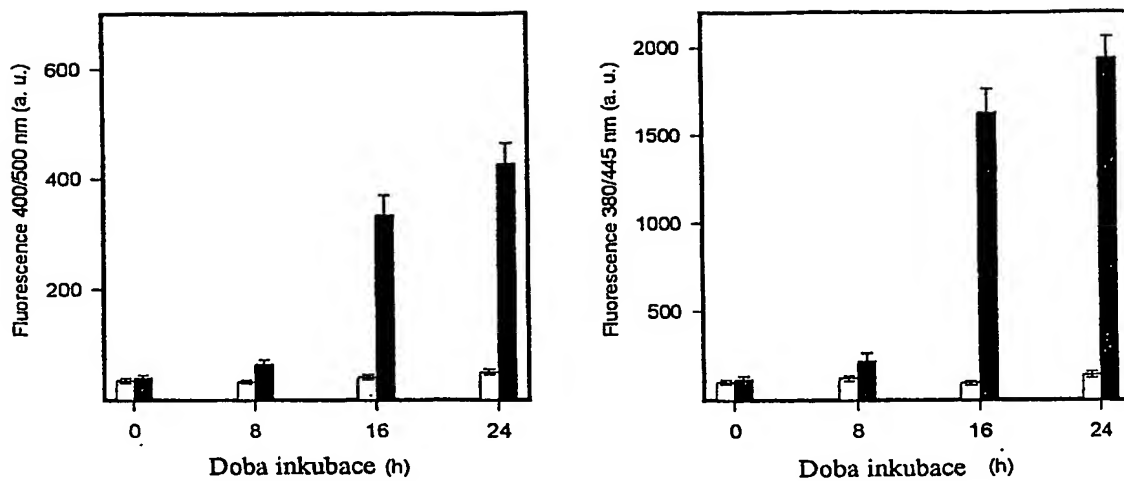


Obsah DNA

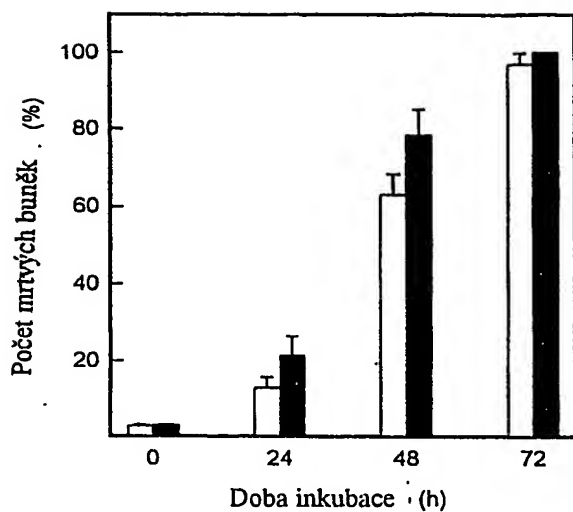


Obsah DNA

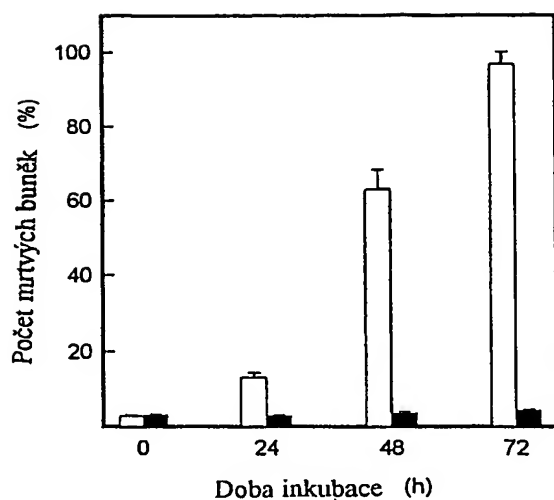
Obr. 8. Vliv 2OH3MeOBAPR (6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid) na buněčný cyklus. Buňky byly kultivovány a) ve standardním v médiu bez 2OH3MeOBAPR (kontrola), b) v médiu obsahujícím 5 μM 2OH3MeOBAPR po dobu 24h před analýzou pomocí průtokové cytometrie.



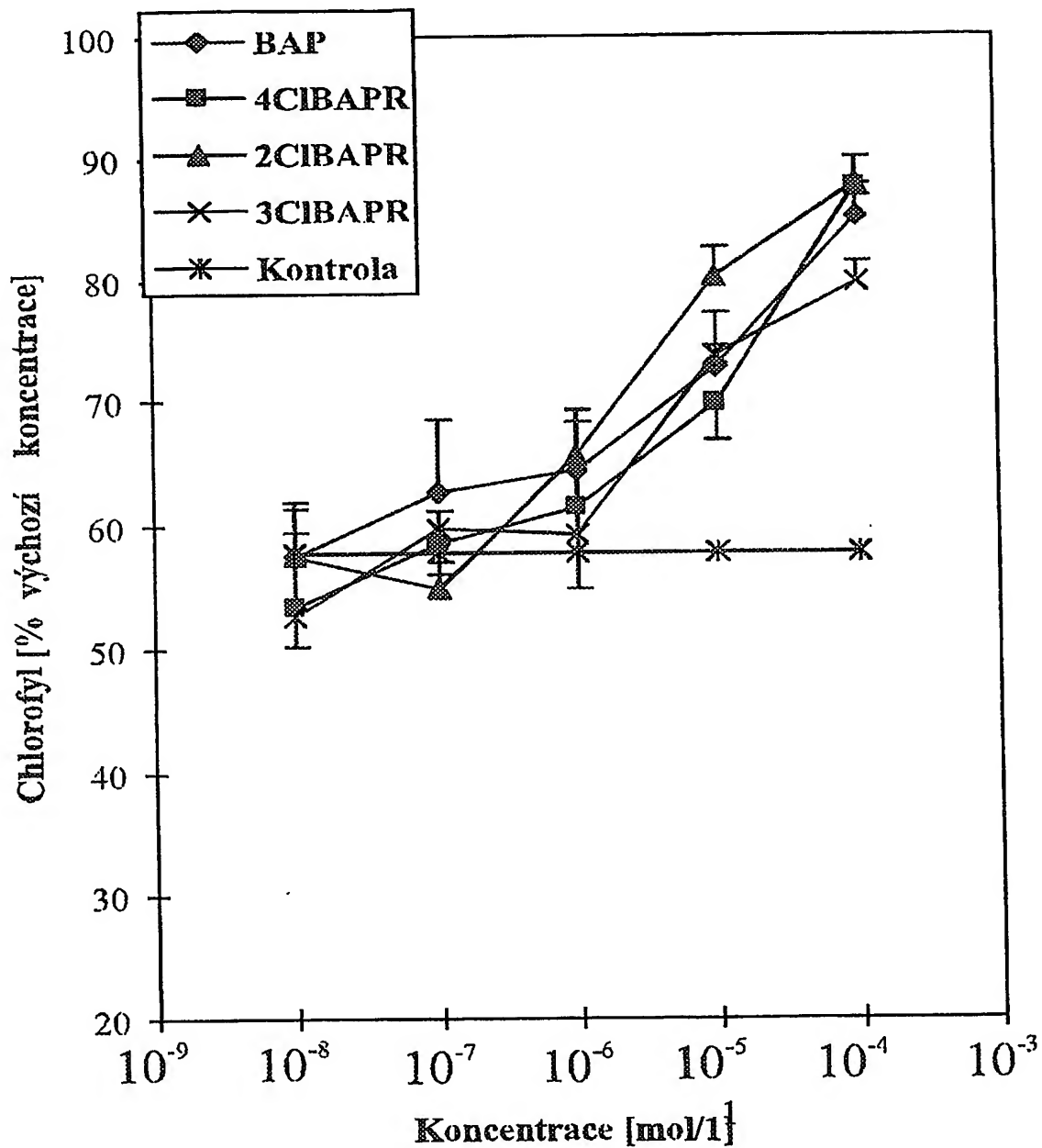
Obr. 9. Vliv 2OH3MeOBAPR na aktivaci kaspázových proteáz. Buňky kultivované ve standardním médiu bez 2OH3MeOBAPR (bílé sloupce), buňky kultivované v médiu obsahujícím 20 μ M 2OH3MeOBAPR (černé sloupce). Relativní hydrolýza substrátu pro kaspázu-9 Ac-LEHD-AFC a) a kaspázu-3 Ac-DEVD-AMC b).



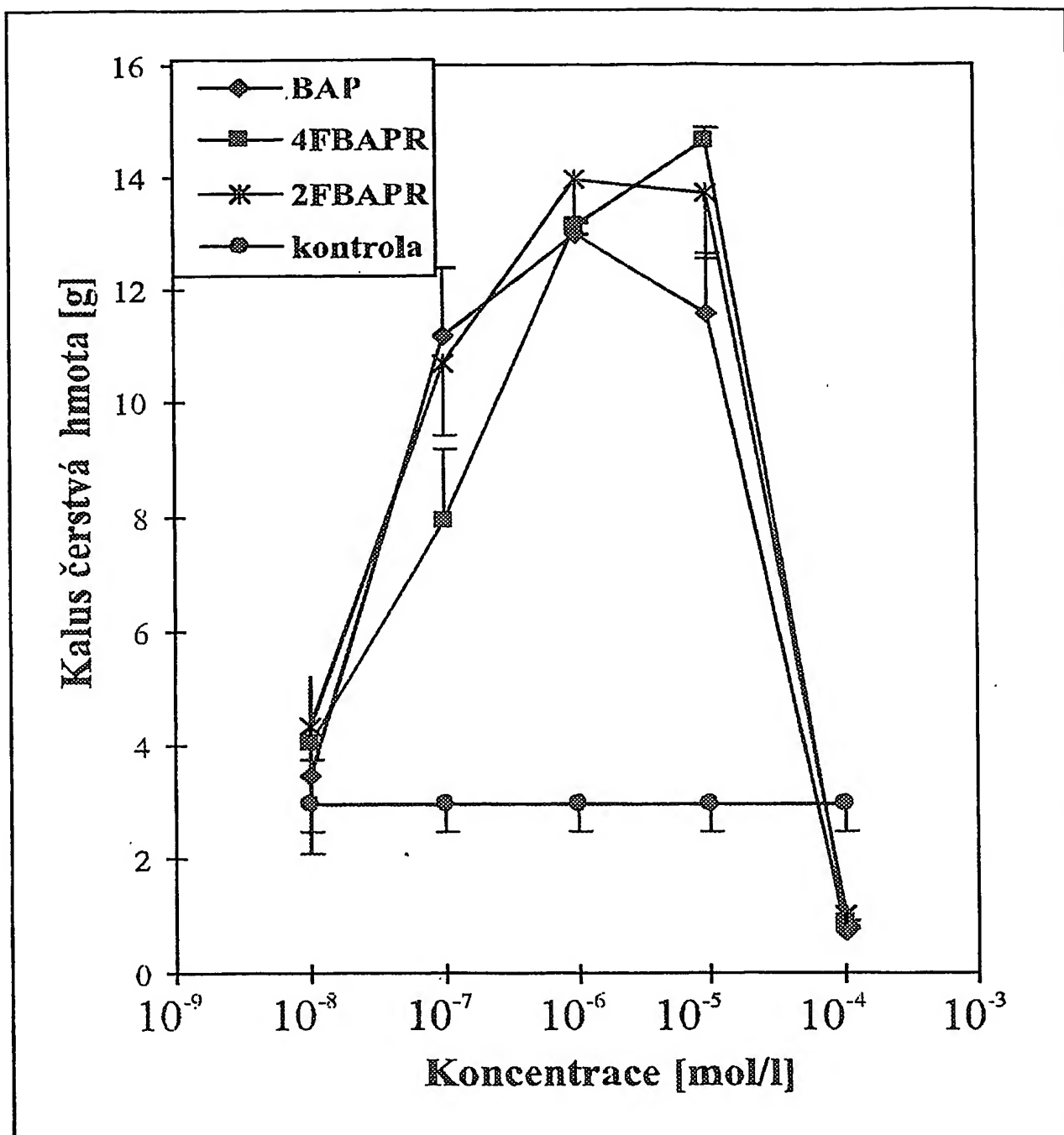
Obr. 10: Vliv kaspázového inhibitoru Z-VAD-FMK na viabilitu buněk HL-60 kultivovaných v přítomnosti iPA. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 20 μM 2OH3MeOBAPR (bílé sloupce) a 20 μM 2OH3MeOBAPR v kombinaci s 50 μM Z-VAD-FMK (černé sloupce) a buňky byly kultivovány 72h. V průběhu inkubace byla stanovována viabilita buněk pomocí kombinovaného barvení FDA/PI.



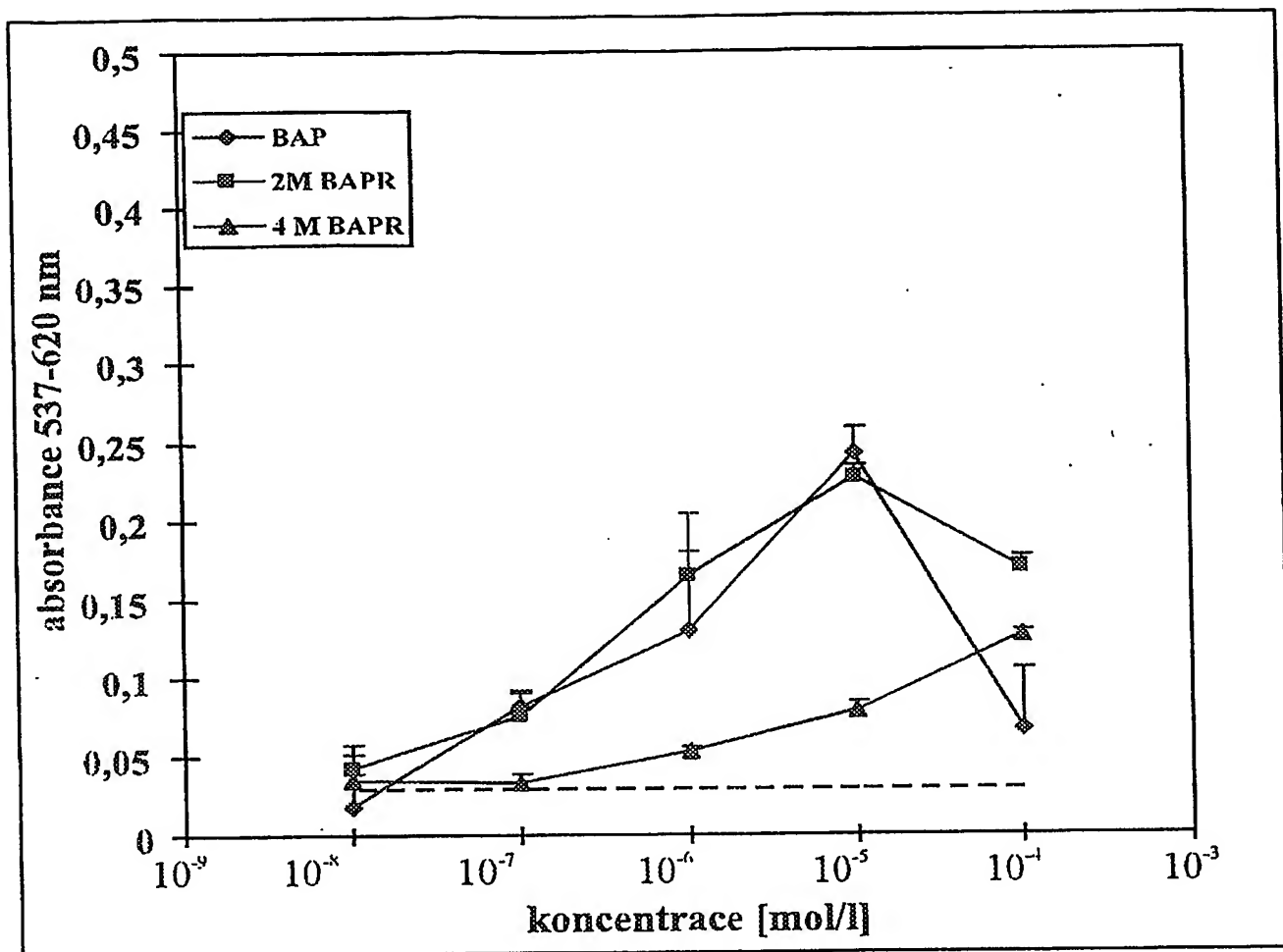
Obr. 11: Vliv inhibitoru adenosin kinázy 4-amino-3-iodo-1 β -D-ribofuranosylpyrazolo [3,4-d]-pyrimidine (AIRPP), na viabilitu buněk HL-60 kultivovaných v přítomnosti iPA. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 20 μ M 2OH3MeOBAPR (bílé sloupce) a 20 μ M 2OH3MeOBAPR v kombinaci s 1 μ M AIRPP (černé sloupce) a buňky byly kultivovány 72h. V průběhu inkubace byla stanovována viabilita buněk pomocí kombinovaného barvení FDA/PI.



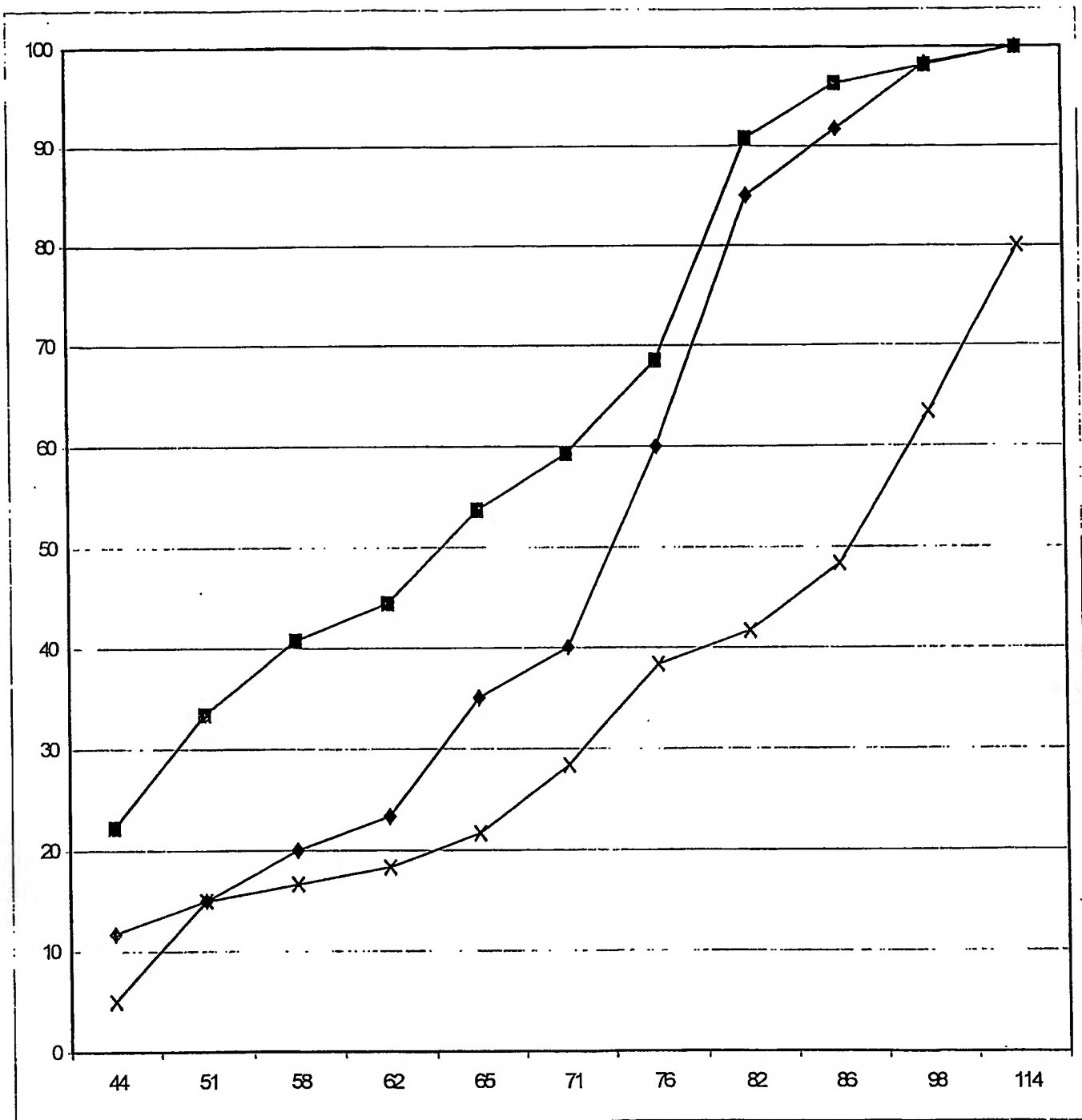
Obr. 12: Vliv nových cytokininů na retenci chlorofylu v extirpovaných listových segmentech pšenice. Prezentované hodnoty jsou vyjádřeny v % výchozího obsahu chlorofylu v čerstvých listech před inkubací s cytokininy. Přerušovaná čára představuje kontrolní měření bez přítomnosti cytokininů, tj. $57,7 \pm 0,9$.



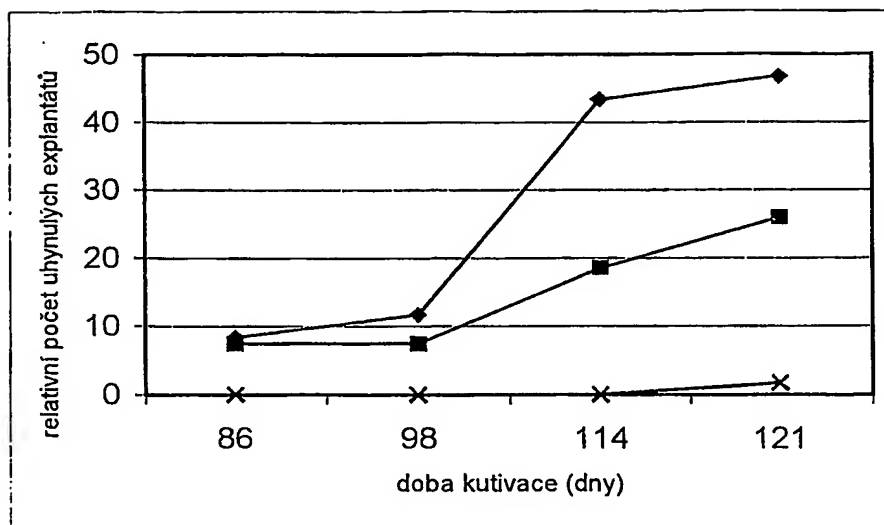
Obr. 13: Vliv nových cytokininů na růst cytokinin-dependentního kalusu tabáku. Přímka —●— představuje kontrolní měření bez přítomnosti cytokininů, tj. $2,5 \pm 0,3$ g.



Obr. 14: Vliv nových cytokininů na syntézu betacyaninu v kotyledonárních/hypokotylárních explantátech *Amaranthus caudatus*. Prezentované hodnoty představují rozdíly v jednotkách O.D. mezi absorbancí při 537 a 620 nm.



Obr. 15. Relativní počet explantů s alespoň jedním hnědým listem v závislosti na čase
(■: BAP, ●: mT, ▲: mMeOBAPR)



Obr. 16. Relativní počet uhynulých explantů v závislosti na čase (■: BA, ●: mT, ▲: mMeOBAPR)



Obr 17. Vlevo: uhynulý explantát *Rosa hybrida* na mediu obsahujícím BAP; vpravo: zdravý explantát *Rosa hybrida* na mediu s mMeOBAPR po 121 dnech kultivace